

**DIE ADSORPTION VON STEROIDEN AN  
FLORISIL UND DIE REINIGUNG AN  
CHOLESTYRAMIN BEI DER BESTIMMUNG  
VON  
HORMONGRUPPEN UND EINZELSTEROIDEN  
NACH GASCHROMATOGRAPHIE**

**Johann Bauer**

**1973**  
**—**





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus der I. Medizinischen Klinik der Universität München  
Direktor: Professor Dr. med. H. Schwiegk

DIE ADSORPTION VON STEROIDEN AN FLORISIL UND DIE REINI-  
GUNG AN CHOLESTYRAMIN BEI DER BESTIMMUNG VON HORMONGRUP-  
PEN UND EINZELSTEROIDEN NACH GASCHROMATOGRAPHIE

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin  
verfaßt und einer Hohen Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Johann B a u e r

aus  
München

1972



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H.J. Karl  
Mitberichterstatter: Prof. Dr. H. Schwiegk  
Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 16.1.1973

MEINEN ELTERN  
IN DANKBARKEIT GEWIDMET



## INHALTSVERZEICHNIS

|                                                                                                                | SEITE |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| EINLEITUNG                                                                                                     | 1     |
| ALLGEMEINE VORAUSSETZUNGEN                                                                                     | 3     |
| DIE EINZELNEN METHODEN                                                                                         | 8     |
| A, ADSORPTION AN FLORISIL UND COLORIMETRISCHER<br>NACHWEIS DER 17 - KS UND DER 17 - OHCS                       |       |
| I. GEWINNUNG UND COLORIMETRISCHER NACHWEIS<br>DER 17 - KS AUS URINPROBEN                                       | 8     |
| II. GEWINNUNG UND COLORIMETRISCHER NACHWEIS<br>DER 17 - OHCS AUS URINPROBEN                                    | 18    |
| B, ADSORPTION AN FLORISIL UND GAS-CHROMATOGRAPHI-<br>SCHER NACHWEIS DER 17 - KS UND DER 17 - OHCS              |       |
| I. GAS-CHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS DER<br>17 - KS IN DEM NACH DER ADSORPTIONSME-<br>THODE GEWONNENEN ELUAT    | 33    |
| II. GAS-CHROMATOGRAPHISCHER NACHWEIS DER<br>17 - OHCS IN DEM NACH DER ADSORPTIONS-<br>METHODE GEWONNENEN ELUAT | 42    |
| C, MÖGLICHE KOMBINATIONEN DER VIER NACHWEIS-<br>METHODEN                                                       | 52    |
| ZUSAMMENFASSUNG                                                                                                | 54    |
| LITERATURVERZEICHNIS                                                                                           | 56    |

## VERWENDETE ABKÜRZUNGEN

F = Cortisol = 11 $\beta$ ,17 $\alpha$ , 21-trihydroxypregn-4-en-3,20-dion

E = Cortison = 17 $\alpha$ , 21-dihydroxypregn-4-en-3,11,20-trion

THF = Tetrahydrocortisol = 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrahydroxy-  
5 $\beta$ -pregnan-20-on

THE = Tetrahydrocortison = 3 $\alpha$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-5 $\beta$ -pre-  
gnan-11,20-dion

Testo = Testosteron = 17 $\beta$ -hydroxy-androst-4-en-3-on

DHT = Dihydrotestosteron = 17 $\beta$ -hydroxy-androstan-3-on

Ätio = Ätiocholanolon = 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on

Andro = Androsteron = 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on

DHEA = Dehydroepiandrosteron = 3 $\beta$ -hydroxy-androst-5-en-17-on

11-keto-androsteron = 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-11,17-dion

11-OH-androsteron = 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\alpha$ -androstan-17-on

11-keto-ätiocholanolon = 3 $\alpha$ -hydroxy-5 $\beta$ -androstan-11,17-dion

11-OH-ätiocholanolon = 3 $\alpha$ ,11 $\beta$ -dihydroxy-5 $\beta$ -androstan-17-on

GC = Gas-Chromatographie

PSR = Porter-Silber-Reaktion

ZiR = Zimmermann-Reaktion

17 - KS = 17 - Ketosteroide

17 - OHCS = 17 - Hydroxycorticosteroide

TMSi - Äther = Tri-Methyl-Silyl-Äther

MO = Methyl-Oxim

Flo/Chol - Methode = Florisil - Cholestyramin - Methode

IpM = Impulse pro Minute

BSA = Bis - trimethylsilyl - acetamid

TMCS = Trimethyl - chloro - silan

## EINLEITUNG

Die Messung der 17 - Ketosteroide (17 - KS) und der 17 - Hydroxycorticosteroide (17 - OHCS) im Urin ermöglicht eine indirekte Aussage über die Hormonproduktion der Nebennierenrinde. Es gibt mehrere Bestimmungsmethoden für beide Hormongruppen (48). Sie fußen meist auf Farbreaktionen und anschließender colorimetrischer Messung.

Die colorimetrischen Nachweismethoden wurden für spezielle wissenschaftliche Fragestellungen in neuerer Zeit von gas-chromatographischen Analysen ersetzt. Von Vorteil sind bei der Gas-Chromatographie die sehr geringen Probenmengen, die benötigt werden, um exakte quantitative Ergebnisse zu erhalten. Außerdem lassen sich die Komponenten der Hormongruppen (z.B. der 17 - KS) einzeln erfassen. Nach Breuer und Nocke (6) besitzt " die Gas-Chromatographie nicht nur unter den verschiedenen bekannten Chromatographiemethoden die höchste Trennleistung und Empfindlichkeit, sie ermöglicht gleichzeitig auch eine quantitative Aussage ".

Vorbedingungen für ein erfolgreiches Arbeiten am Gas-Chromatographen sind:

1. die gute Vorreinigung und Aufbereitung der Proben
2. die Bildung stabiler Derivate der im Gas-Chromatographen zu untersuchenden Substanzen, wenn diese unter den Bedingungen der Gas-Chromatographie nicht stabil oder - bei Substanzgemischen - voneinander nicht zu trennen sind.

Bereits 1966 haben Noiret und Devis (72) nicht aktiviertes Florisil benützt, um Steroidhormonextrakte zu fraktionieren. Die Möglichkeit einer Adsorption der freien bzw. durch Hydrolyse freigesetzten Steroide aus wässrigen Lösungen (z.B. Urin) an Florisil nach Wiedemann, Raith und Karl (95) wies auf neue, einfache Extraktionsmethoden hin. Dieses Verfahren wurde von den gleichen Autoren auch zur Aufbereitung von Urinproben für die Gas-Chromatographie von Androge-

nen verwendet (75). Die guten Ergebnisse, die dabei erzielt wurden, legten es nahe, die Anwendbarkeit der Adsorption von Steroidhormonen an Florisil als Ersatz für die Extraktion von Steroidhormonen aus biologischem Material mit organischen Lösungsmitteln zu untersuchen.

Zur Reinigung der hormonhaltigen äthanolischen Eluate der Florisilsäulen wurde Cholestyramin eingesetzt. Dieser Anionenaustauscher (18) wird in der Medizin als Mittel gegen Juckreiz bei Ikterus (10) und zur Senkung des Cholesterinspiegels bei der Hyperlipoproteinämie vom Typ II nach Fredrickson (24) verwendet.

Folgende Leitfragen bestimmten die Richtung der Untersuchungen:

A, in Bezug auf die colorimetrischen Methoden

AI. Läßt sich nach Adsorption der Hormone an Florisil das Eluat mit der Zimmermann-Reaktion kombinieren und läßt sich damit die Originalmethode zur Bestimmung der 17 - KS vereinfachen?

AII. Läßt sich nach Adsorption der Hormone an Florisil das Eluat mit der Porter-Silber-Reaktion kombinieren und läßt sich damit die Originalmethode zur Bestimmung der 17 - OHCS vereinfachen?

B, in Bezug auf die gas-chromatographischen Methoden

BI. Lassen sich die 17 - KS in dem über Cholestyramin gereinigten Eluat mit dem Gas-Chromatographen nachweisen?

BII. Lassen sich die 17 - OHCS in dem über Cholestyramin gereinigten Eluat mit dem Gas-Chromatographen nachweisen?

C, Welche Kombination der vier Nachweisverfahren erlaubt auf Grund seiner Beschaffenheit ein und dasselbe Eluat?

In Beantwortung der Fragenkomplexe A, und B, wurden vier Nachweismethoden entwickelt, die im Hauptteil der Arbeit einzeln erörtert werden. Die Besprechung jeder Methode folgt einem gleichbleibenden Schema: Methode - Diskussion der Methode - Ergebnisse - Diskussion der Ergebnisse. Auf die Frage unter C, wird nach Darstellung der vier Methoden eingegangen.

## ALLGEMEINE VORAUSSETZUNGEN

### I. Prinzip des Einsatzes des Florisils

Zur Extraktion der freien bzw. durch Hydrolyse aus ihrer Bindung freigesetzten Steroidhormone aus wässrigen Lösungen läßt man die Proben über eine kleine mit Florisil beschickte Chromatographiesäule (Florisilsäule) laufen. Die Säule kann eine mit Glaswatte versehene Pasteurpipette sein, eine Glassäule mit geeigneter Glasfritte oder eine Plastiksäule mit Filter. Letztere ist im Handel erhältlich und wurde bei den Untersuchungen eingesetzt.

Beim Durchlauf durch das unbehandelte Florisil werden u.a. die Steroidhormone adsorbiert. Mit abs. Äthanol lassen sie sich von der Säule eluieren. Dabei gehen auch andere, ebenfalls adsorbierte Substanzen mit. Sie stören als unspezifische Chromogene die zum Nachweis der Steroidhormone mit dem Eluat durchgeführten Farbreaktionen und als compound noise die gaschromatographischen Analysen. Diese unspezifischen Substanzen gilt es zu beseitigen. Es kann erreicht werden, indem man das Florisil nach dem Durchlauf der Probe, vor der Elution mit Äthanol mit einer Lauge wäscht (95). Zum gleichen Ziel führt der Einsatz geeigneter Adsorptionsmittel oder Ionenaustauscher (z.B. Cholestyramin), die - in Chromatographiesäulen gefüllt und bei der Elution der Florisilsäulen nachgeschaltet - die störenden Chromogene abfangen, die Steroidhormone durchlaufen lassen.

Die weitere Verarbeitung der äthanolischen Eluate kann ohne Umwege erfolgen, da die Reagenzlösungen von vorneherein abs. Äthanol enthalten:

so die äthanolische 1,3 - Dinitrobenzollösung für die Zimmermann-Reaktion (ZiR),

so für die Porter-Silber-Reaktion (PSR) die Schwefelsäure-Alkohollösung (Blankwertlösung) und die Phenylhydrazin-Schwefelsäure-Alkohollösung (Reagenzwertlösung).

Für die Gas-Chromatographie läßt sich das Äthanol unter  $N_2$ -Strom abblasen. Die Hormone werden mit Äther aus dem trockenen Rückstand in Spitzgläser oder Eppendorfgeläße übergeföhrt. Das Abblasen des Äthers ermöglicht die Durchführung der Silylierungsreaktionen.

## II. Bestimmung der Wiederfindungsrate radioaktiv markierter Hormone (radioaktive recovery):

Für jede Bestimmung 0,1 ml Eluat in ein Packardglas geben, dazu 0,9 ml Äthanol abs. und 10 ml Szintillatorflüssigkeit (doppelt ansetzen).

Berechnung der IpM an  $^{14}C$  bzw.  $^3H$  - Aktivität mit 1. und 2. Kanal:

$^{14}C$  Impulse/min = IpM des 1.Kanals - Leerwert 1. Kanal

$^3H$  Impulse/min = IpM des 2.Kanals - (IpM  $^{14}C$  x spill) - Leerwert 2.Kanal

spill: Maschinenstandard (eigener Standard)  $^{14}C$

IpM 2.K. - Leerwert 2.K.

IpM 1.K. - Leerwert 2.K.

Berechnung der recovery:  $\frac{\text{IpM} \times 50 \times 100}{\text{Zugesetzte Rad.Akt.}}$  = recovery in %

Die Messung der Aktivität wurde im Packard Tri-carb je 2 x 10 min durchgeführt.

## III. Benötigtes Material:

1. Urine: bei den verwendeten Urinen handelt es sich um Sammelurine, die bei der Routinearbeit des endokrinologischen Labors der I. Med.Klinik der Univ. München auf den Gehalt an 17 - KS und 17 - OHCS untersucht wurden.

## 2. Reinsubstanzen:

### a, radioaktiv markierte

- (1,2-<sup>3</sup>H)-Cortisol = (1,2-<sup>3</sup>H)-11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-trihydroxy-pregn-4-en-3,20-dion (spezif. Aktivität 13C/mMol)  
(1,2-<sup>3</sup>H)-Tetrahydrocortisol = (1,2-<sup>3</sup>H)-3 $\alpha$ ,11 $\beta$ ,17 $\alpha$ ,21-tetrahydroxy-pregnan-20-on  
(spezif. Aktivität 58,8 mC/mMol)  
(4-<sup>14</sup>C) Dehydroepiandrosteron = (4-<sup>14</sup>C)-3 $\beta$ -hydroxy-androst-5-en-17-on (spezif. Aktivität 22 C/mMol)

Der Reinheitsgrad der radioaktiv markierten Steroide, papier- und/oder gas-chromatographisch geprüft, betrug über 95 %.

(New England Nuclear Corporation, Boston, Mass.)

### b, nicht markierte

Cortisol, Tetrahydrocortisol, Tetrahydrocortison, Testosteron, Androsteron, Ätiocholanolon, Dehydroepiandrosteron, Dihydrotestosteron, 11-keto-Androsteron, 11-OH-Androsteron, 11-keto-Ätiocholanolon, 11-OH-Ätiocholanolon  
(Fa. Merck und Fa. Serva)

## 3. Testurine

(Fa. Hyland, Div. Travenol Laboratories Inc., Costa Mesa, Calif.)

## 4. Ketodase

(Fa. General Diagnostics Div., Warner Chilcott Laboratories Div. Morris Plains N.J.)

## 5. Silylierungsmittel:

BSA (bis-trimethylsilyl-acetamid) (Fa. Pierce Chemical Company, Rockford III.)

Trimethylchlorosilan (Fa. Serva u. Pierce Chem.)

Hexamethyldisilazan (Fa. Schuchardt, München)

Methoxamine Hydrochloride (Applied Science Laboratories Inc. State Colleg PA.)

## 6. Adsorptionsmittel:

Florisil (Fa. Serva, Feinbiochemica Heidelberg; reinst, Magnesiumtrisilicat für Säulenchromatographie, Korngröße 60 - 100 mesh, 0,15 - 0,25 mm A)

## 7. Ionenaustauscher:

Cholestyramin (Cuemid<sup>®</sup>; Fa. Merck Sharp & Dohme, Div. of Merck & Co. Inc. West Point PA;

\*Cholestyramine resin, powder for oral use)

## 8. Reagenzien:

Äthanol abs. p.a. (Merck)

Chloroform p.a. "

Diäthyläther p.a. "

Dinitrobenzol, rekristallisiert (Merck)

Essigsäure, 0,2 n p.a. (Merck)

verd.  $H_2SO_4$  (190 ml konz.  $H_2SO_4$  + 310 ml  $H_2O$ )

3n KOH (Merck)

Na-acetat 0,2 n "

NaOH reinst "

Phenylhydrazin rekristallisiert (Merck)

PPO = 2,5-Diphenyloxazol (Packard Instrument Company, Ill.USA)

POPOP=1,4-bis-2(5-phenyloxazolyl)-benzol (Packard)

Szintillatorflüssigkeit: 4,0 g PPO + 0,1 g POPOP in 1000 ml Toluol (Merck)

Tetrazoliumblau = Blue Tetrazolium (Nutritional Biochemicals Corp., Cleveland USA)

## 9. Glaswaren:

Serumgläser (Zentrifugenglasröhrchen) zu 10 und 20 ml

Schliffspitzgläser zu 7 ml

Pasteurpipetten

Enzympipetten; Auslaufpipetten; Eppendorf-Pipetten zu 1000, 100 und 50 Mikroliter

Hamilton Precision Syringes (Glass)

Hamilton CR 700 - 20 automatische Spritze

(Hamilton Co. Whittier Calif.)

Glaslöffelchen mit einem Fassungsvermögen von 400 mg Florisil  
Plastiksäulen (Bio-Rad Laboratories, Richmond Calif.)

10. Apparate:

pH-Meter

Inkubator

Beckmann-Spektralphotometer DU

Packard-Radiochromatogram Scanner Model 7201 (Papier What-  
man Nr. 1)

Packard-Gaschromatograph Model 7820 mit FID (Flammenioni-  
sationsdetektor)

Packard-Liquid-Scintillation-Spectrometer Model 2002 (Tricarb)  
mit Zubehör

N<sub>2</sub>-Abblasvorrichtung (Gasflaschen, Gasleitungen, Blaskapil-  
laren), Wasserbad

## DIE EINZELNEN METHODEN

### A. Adsorption an Florisil und colorimetrischer Nachweis der 17 - KS und der 17 - OHCS

### AI. Gewinnung und colorimetrischer Nachweis der 17 - KS aus Urinproben

#### 1. Arbeitsvorschrift:

1) Urintagesmenge abmessen; der Urin muß exakt gesammelt worden sein.

2) Ansetzen und Hydrolyse: 10 ml Urin von der Tagesmenge in ein Reagenzglas pipettieren und 1,0 ml konz. HCl p.a. dazugeben, 15 min in einem kochenden Wasserbad stehen lassen.

3) Extraktion: Vorbereitung der Säulen. Die Plastiksäulen mit ca. 400 mg Florisil beschicken, mit Wasser füllen und gut durchschütteln. Das Florisil soll dabei möglichst ganz im Wasser aufgewirbelt werden. Wenn es sich wieder setzt, darauf achten, daß keine Luftblasen entstehen. Die fertige Säule 1 x mit Wasser vorwaschen.

Die gekochten Urinproben auf die Säulen gießen und den Urin durchlaufen lassen.

Die Säulen mit 5 ml 3n KOH waschen.

4) Elution: Die Säulen auf Zentrifugenglasröhrchen stecken (innerer Durchmesser der Röhrchen 1,3 cm) und mit 2,5 ml Äthanol abs. p.a. in 3 Portionen zu 0,5/1/1 ml eluieren. Das Eluat gut durchschütteln und vermischen.

5) Farbreaktion: 1 ml des gut durchgemischten Eluates in ein Reagenzglas vorlegen. Bei jedem Bestimmungssatz (10-20 Proben) 1 Leerwert (1 ml Äthanol abs.) und 2 Hormonwerte (50 Mikrogramm DHEA in 1 ml Äthanol abs. und 150 Mikrogramm DHEA in 1 ml Äthanol abs.) mitlaufen lassen. In jedes Reagenzglas 1 ml 1 % DNB-Lösung (1g Dinitrobenzol ad 100 ml Äthanol abs. p.a.) und 1 ml 3 n KOH geben, gut durchschütteln. Die Reagenzgläser für 90 min in ein Wasserbad von 25° C stellen. In jedes Reagenzglas 4 ml Diäthyläther p.a.

mit einer Zugpipette schnell dazugeben, Reagenzglas 3 x kippen (wobei die Öffnung des Reagenzglases mit dem Daumen gut verschlossen wird - Einmalhandschuhe!). Nach kurzer Zeit hat sich die KOH als untere, gelbe Phase abgesetzt. Die obere, violette Phase abdekantieren, durch ein hartes Faltenfilter (Schleicher und Schüll 595 1/2) in ein Reagenzglas filtrieren.

Messung: Mit dem Beckmann-Spektralphotometer DU bei der Wellenlänge 510 nm die Proben gegen den mitgeführten Leerwert messen.

Berechnung: An der Eichkurve die den abgelesenen Extinktionswerten entsprechenden Mikrogrammwerte ablesen.

Mikrogramm x Tagesmenge x 2,5 =  $\mu$ g/24 h  
10000

## 2. Diskussion der Methode:

- ad 1): Das Sammeln beginnt nach Entleerung der Blase am Morgen des 1. Tages und dauert den ganzen Tag bis zum nächsten Morgen. Der Morgenurin des 2. Tages gehört noch zum sog. 24 h - Urin.
- ad 2): Die engen Reagenzgläser und die kurze Kochzeit erlauben es, auf Rückflußkühler zu verzichten. Den Beweis liefern die unter 3d beschriebenen Korrelanzuntersuchungen.
- ad 3): Es empfiehlt sich, das Waschen mit 5 ml 3n KOH vor der Elution mit abs. Äthanol durchzuführen, obwohl gezeigt werden konnte, daß es im Prinzip möglich ist, das Reinigen mit 3n KOH und das Eluieren mit 5 ml abs. Äthanol zu kombinieren.

Nachweis:

Von einem Gemisch 3n KOH/Äthanol abs. 1/1 wurden 5 ml für jede Probe verwendet. 2 ml dieses "Eluates" pipettierte man in ein Reagenzglas und gab 1 ml 1 % DNB dazu, schüttelte und stellte das Reagenzglas in ein Wasserbad von 25° C. Die weiteren Schritte der ZiR blieben die gleichen.

Gefunden wurden folgende Werte:

4,6 und 4,2 mg/24 h bei einem Vergleichswert von 4,7  
 18,0 u. 23,6 mg/24 h " " " " 22,1  
 4,4 und 4,9 mg/24 h " " " " 4,4

Wegen der Notwendigkeit, das Gemisch frisch anzusetzen, mußte jedoch dem Vorgehen der Vorzug gegeben werden, die 3n KOH und das Athanol zwar getrennt, aber dafür direkt aus den Flaschen abzupipettieren.

ad 3): Es war nicht nötig, die KOH in Portionen auf die Säulen zu geben. Nachweis:

Angesetzt wurden 10 Proben (Tabelle 1).

| PROBEN-<br>NUMMER | INHALT                                                                              |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                 | 10 ml Wasser)                                                                       |
| 2                 | 10 ml Wasser) + 50 Mikrogramm DHEA + 0,2 ml $^{14}\text{C}$ -DHEA<br>(= 10 000 IpM) |
| 3                 | 10 ml Wasser)                                                                       |
| 4                 | 10 ml Wasser) + 100 Mikrogramm DHEA + 0,2 ml $^{14}\text{C}$ -DHEA                  |
| 5                 | 10 ml Urin)                                                                         |
| 6                 | 10 ml Urin) + 0,2 ml $^{14}\text{C}$ -DHEA                                          |
| 7                 | 10 ml Urin)                                                                         |
| 8                 | " " ) + 50 Mikrogramm DHEA + 0,2 ml $^{14}\text{C}$ -DHEA                           |
| 9                 | " " )                                                                               |
| 10                | " " ) + 100 Mikrogramm DHEA + 0,2 ml $^{14}\text{C}$ -DHEA                          |

Tabelle 1: Schema des Versuchsansatzes zur Klärung der Abhängigkeit der Wiederfindungsrate von  $^{14}\text{C}$ -DHEA von der portionsweisen Zugabe der Wasch-KOH

Bei den Proben mit ungeraden Nummern wurden 5 ml 3 n KOH in einer Portion eingesetzt, bei denen mit geraden Nummern 2 x 2,5 ml (zwei Portionen).

Ergebnis s. Tabelle 2

| PROBEN-<br>NUMMER | STUMME RECOVERY | RADIOAKTIVE. RECOVERY |
|-------------------|-----------------|-----------------------|
| 1                 | 90 %            | 78 %                  |
| 2..               | 96 %            | 88 %                  |
| 3                 | 96 %            | 91 %                  |
| 4..               | 90 %            | 81 %                  |
| 5                 | ----            | 97 %                  |
| 6..               | ----            | 89 %                  |
| 7                 | 66 %            | 97 %                  |
| 8..               | 60 %            | 97 %                  |
| 9                 | 69 %            | 97 %                  |
| 10..              | 81 %            | 85 %                  |

Tabelle 2: Unabhängigkeit der Wiederfindungsraten von  $^{14}\text{C}$ -DHEA von der portionsweisen Zugabe der Wasch-KOH

ad 3): Mehr als 5 ml 3n KOH einzusetzen hat keinen Sinn, da bei steigender KOH-Menge die gemessenen Extinktionen abfallen. Nachweis:

Ein Patientenurin wurde 6 x angesetzt - die Menge der Wasch-KOH variiert (Tabelle 3).

| PROBEN-<br>NUMMER | INGESETZTE 3 n<br>KOH IN ml | SPEZ.EXTINKTION |
|-------------------|-----------------------------|-----------------|
| 1                 | 5                           | 0,400           |
| 2                 | 5                           | 0,410           |
| 3                 | 10                          | 0,385           |
| 4                 | 10                          | 0,400           |
| 5                 | 15                          | 0,375           |
| 6                 | 15                          | 0,355           |

Tabelle 3: Abfall der Extinktionswerte bei steigender KOH-Menge

### 3. Ergebnisse:

#### a. Vergleichsuntersuchungen

Tabelle 4 zeigt den Ansatz.

| PROBEN-<br>NUMMER | INHALT DER PROBE                                                                                       |
|-------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1                 | 10 ml 17 - KS Kontrollurin (Sollwert 7,8 mg/1000 ml)                                                   |
| 2                 | idem                                                                                                   |
| 3                 | 10 ml Wasser + 75 Mikrogramm DHEA                                                                      |
| 4                 | idem                                                                                                   |
| 5                 | Hormonwert: 75 Mikrogramm DHEA in 1 ml Äthanol abs.<br>+1 ml 3 n KOH<br>+1 ml 1 % DNB<br>"direkte" ZiR |

Tabelle 4: Versuchsansatz für die Vergleichsuntersuchungen

Tabelle 5 zeigt die erhaltenen Ergebnisse.

| PROBEN-<br>NUMMER | STUMME RECOVERY | mg/24 h |
|-------------------|-----------------|---------|
| 1                 |                 | 7,2     |
| 2                 |                 | 7,8     |
| 3                 | 92 %            |         |
| 4                 | 88 %            |         |
| 5                 | 100 %           |         |
| 6                 | 96 %            |         |

Tabelle 5: Ergebnisse der Vergleichsuntersuchungen. Der für die Kontrollurine angegebene Wert wurde erreicht; die Wiederfindungsrate von DHEA war gut, die ZiR ungestört.

b, Wiederfindungsrate der eingesetzten nicht radioaktiv markierten Reinsubstanzen ( = Stumme recovery )

6 verschiedenen Urinproben wurden je 50 Mikrogramm DHEA zugesetzt. Wiedergefunden wurden

90 %, 96 %, 66 %, 92 %, 69 %, 88 % .

c, Recovery von  $^{14}\text{C}$  - DHEA (=Radioaktive recovery)

32 verschiedenen Urinproben wurde 0,1 ml  $\pm$  20 000 IpM  $^{14}\text{C}$  - DHEA zugesetzt.

Der Mittelwert der radioaktiven recovery betrug 79,1 %. Abbildung 1 zeigt die Häufigkeitsverteilung der einzelnen Werte der radioaktiven recovery.

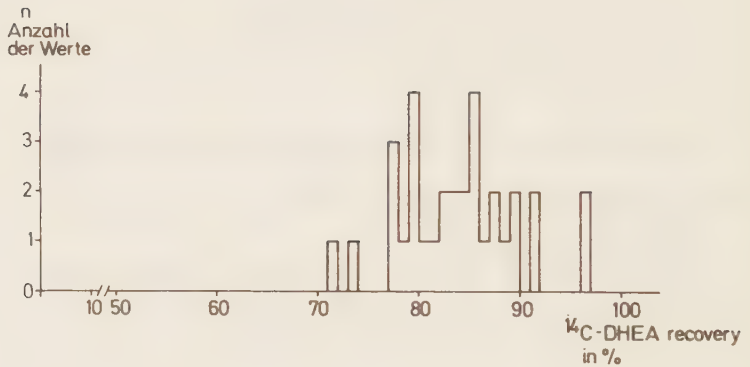


Abb. 1: Die Häufigkeitsverteilung der Wiederfindungsraten von  $^{14}\text{C}$  - DHEA

#### d, Korrelanzuntersuchungen

Die Korrelanz zu den nach der Originalmethode gefundenen Werten betrug

aa, bei der Methode mit Einsatz der Rückflußkühlung bei der Hydrolyse ( wie bei der Originalmethode ) - auf der Grundlage von 56 Wertepaaren: 0,932 .  
Abbildung 2 zeigt die Korrelation zwischen den nach der Adsorptionsmethode mit Rückflußkühlung und den nach der Originalmethode gefundenen Werten.

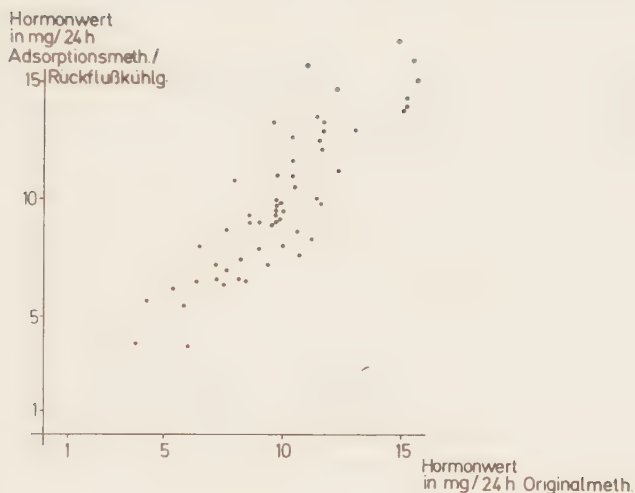


Abb. 2: Die Korrelation zwischen den nach der Adsorptionsmethode mit Rückflußkühlung und den nach der Originalmethode gefundenen Werten

bb, bei der Methode mit Einsatz eines kochenden Wasserbades bei der Hydrolyse -  
 auf der Grundlage von 50 Wertepaaren: 0,922 .  
 Abbildung 3 zeigt die Korrelation zwischen den nach der Adsorptionsmethode mit Wasserbad und den nach der Originalmethode gefundenen Werten.

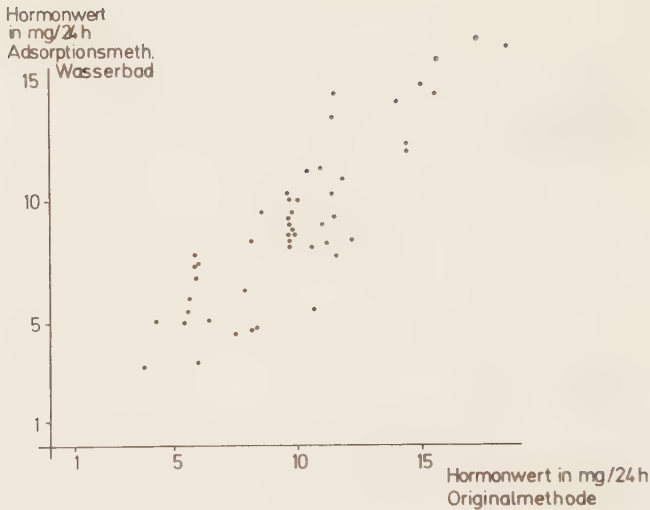


Abb. 3: Korrelation zwischen den nach der Adsorptionsmethode mit Wasserbad und den nach der Originalmethode gefundenen Werten

#### 4. Diskussion der Ergebnisse

Wie zu erwarten, war die Korrelanz zwischen der Methode mit Einsatz der Rückfluskkühlung und der Originalmethode größer - wenn auch nur um 0,01 - als die zwischen der Methode mit Einsatz des Wasserbades und der Originalmethode. Im ersten Fall unterscheiden sich die Methoden in der Extraktionsweise, im zweiten in der Art des Vorgehens bei der Säurehydrolyse und in der Extraktionsweise.

Da die Verwendung des Wasserbades einfacher und leichter zu handhaben ist, wurde dieser Methode der Vorzug gegeben. Aus den Untersuchungen ergab sich folgendes Bild:

Die Florisilsäulenmethode kann die bei der Originalmethode verwendete Chloroformextraktion ersetzen.

- a, Die stumme recovery betrug für DHEA im Mittel 83,5 %.
- b, Die radioaktive recovery von  $^{14}\text{C}$  - DHEA betrug im Mittel 79,1 %.
- c, Die Kontrollurinbestimmung ergab mit 7,2 und 7,8 mg/24 h Werte im Bereich des Sollwertes ( 7,8 mg/24 h ).
- d, Die Korrelanz zwischen Adsorptionsmethode mit Wasserbad und Originalmethode war mit 0,922 gut.

Für die Routinearbeit empfohlen sich:

- 1. die 15-min-Säurehydrolyse der Urinprobe ohne Rückflußkühler in einem kochenden Wasserbad
- 2. eine einmalige Reinigung der Florisilsäule nach dem Urindurchlauf mit 5 ml 3n KOH
- 3. eine Elution der 17 - KS mit Äthanol abs. in drei Portionen zu 0,5/1/1 ml.

Im Vergleich zur Originalmethode ist die Florisilmethode s c h n e l l e r - der zeitliche Arbeitsaufwand für die Bestimmung von 20 Proben beträgt einen halben Arbeitstag (4 h) - und u n g e f ä h r l i c h e r , da das Arbeiten mit Chloroform entfällt.

A II. Gewinnung und colorimetrischer Nachweis der 17 - OHCS aus Urinproben

1. Arbeitsvorschrift:

1) Urintagesmenge abmessen.

2) Ansetzen und Hydrolyse: 1/200 der Tagesmenge (TM) in ein Serumglas (20 ml Fassungsvermögen) geben, das Glas mit aqua dest. auf 10 ml auffüllen - bei  $TM \geq 2000$  ml kein aqua dest., sondern 10 ml unverdünnten Urins verwenden.

Zu jeder Probe 1 ml 0,2 n AcCOOH

1 ml 0,2 n NaAc

0,7 ml Ketodase

hinzufügen.

Das pH jeder Probe auf 4,6 einstellen, die Serumgläser mit Plastikfolie verschließen und in den Wärmeschrank bei  $37^{\circ}$  C für 16 h (über Nacht) stellen.

3) Extraktion: Die Plastiksäulen, für jede Bestimmung 2 Stück, nach folgendem Schema aufstellen

|                   |   |   |   |   |   |   |      |
|-------------------|---|---|---|---|---|---|------|
| a, Florisilsäulen | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |      |
|                   | o | o | o | o | o | o |      |
|                   | o | o | o | o | o | o | usw. |

b, Cholestyraminsäulen 1' 2' 3' 4' 5' 6'

a) In die Säulen 1, 2, 3, 4, 5, 6 usw. je 2 Löffelchen (800 mg) Florisil geben. Die beschickten Säulen mit Wasser fullen, schütteln, bis keine Luftblasen mehr zu sehen sind. (Die Plastiksäule wird so in die Hand genommen, daß der Daumen auf der oberen, großen Öffnung liegt, der 3. Finger die untere kleine Abflußöffnung der Säule verschließt; man soll solange schütteln, bis das Florisil im Wasser aufgeschwemmt ist.) Die Säulen hinstellen und das Wasser ablaufen lassen, nochmals mit einigen ml Wasser nachspülen. Urinproben auf die Säulen geben.

b, Die Cholestyraminsäulen vorbereiten: mit einer tarier-ten, 1 ml Enzympipette, deren Spitze abgeschnitten wurde, in die Säulen 1', 2', 3', 4', 5', 6' usw. 0,5 ml gequollen-nes Cholestyramin einpipettieren. Auf die mit Cholestyramin

beschickte Säule 5 ml 0,2 n AcCOOH geben, die Säule fassen und schütteln bis das Cholestyramin in der Essigsäure aufgeschwemmt ist. Die Säule in das Reagenzglasgestell zurücksetzen, die AcCOOH ablassen. Nicht mit dem Ventilgummiball ausblasen! Mit genau 1 ml Äthanol abs. die Cholestyraminflocken an der Innenseite der Säule zur Fritte hin abspülen. Das Äthanol vollständig ablaufen lassen, nicht mit dem Ventilgummiball ausblasen! Äthanol nicht direkt aus der Flasche pipettieren (an der Pipette hängen Cholestyraminflocken)!

Das abs. Äthanol entzieht dem Cholestyramin Wasser. Das Cholestyramin zieht sich dadurch etwas zusammen, die Randpartien lockern sich, zwischen dem Cholestyraminzylinder und der Säulenwand entsteht ein Spalt. Mit einem Glasstab, dessen Durchmesser etwas kleiner als das Lumen der Säule ist, das Cholestyramin leicht niederdrücken, bis die Randspalten verschwinden.

Die Cholestyraminsäulen wie Fieberthermometer ausschütteln.

4) Elution: Die Cholestyraminsäulen auf Serumgläser (Fassungsvermögen 10 ml, innerer Durchmesser 13 mm) setzen. Nach dem Durchlauf der Urinproben durch die Florisilsäulen die 20 ml - Serumgläser mit 2 ml aqua dest. ausspülen, das Spülwasser auf die Florisilsäule gießen. An die Florisilsäulen die Halteringe anpassen (Abb. 4) und die Florisilsäulen auf die Cholestyraminsäulen stecken.

5 ml Äthanol abs. (frisch angebrochene Flaschen verwenden) auf die obere (Florisilsäule) Säule geben, durch das Elutionssystem durchlaufen lassen. Das Eluat staut sich in der unteren (Cholestyramin-) Säule, ist jedoch nach wenigen Minuten durchgelaufen.



Abb. 4: Das Elutionssystem. Die obere Plastikchromatographiesäule, die mit Florisol gefüllt ist, sitzt mittels eines dazwischengeschalteten Halteringes fest auf der unteren, mit Cholestyramin versehenen Reinigungssäule. Ein Zentrifugenglas mit einem inneren Durchmesser von 13 mm dient dem Auffangen des Eluates.

#### 5) Farbreaktion nach Porter-Silber:

##### a, Ausführung

BW = Blankwert; LW = Leerwert; RW = Reagenzwert

BW des LW: 1 ml Äthanol abs. + 2 ml verd. Schwefelsäure

RW des LW: 1 ml Äthanol abs. + 2 ml verd. Schwefelsäure +  
1,3 mg Phenylhydrazinkristalle

BW der Proben: 1 ml Eluat + 2 ml verd. Schwefelsäure

RW der Proben: 1 ml Eluat + 2 ml RW-Lösung (= 2 ml verd.  
 $H_2SO_4$  + 1,3 mg Phenylhydr.)

Für 1 h in ein Wasserbad bei 60° C stellen.

## b, Colorimetrie

Messung der Extinktionen bei 410 nm.

Die spezifische Extinktion ergibt sich aus der Gleichung:

$E_{\text{spez}} = RW_{\text{Probe}} - (BW_{\text{Probe}} + RW_{\text{Leerwert}})$  bei Messung gegen den  $BW_{\text{Leerwert}}$ .

An der F-Eichkurve die F-Äquivalente in Mikrogramm ablesen: der auf der Eichkurve abgelesene Wert ist numerisch gleich dem gesuchten Wert in mg/24 h. Für die PSR werden nämlich 1 ml des 5 ml - Eluates verwendet, d.h. 1/5 von 1/200 TM = 1/1000 TM.

## 2. Diskussion der Methode:

- ad 2): Es handelt sich um den üblichen Einsatz der Ketodase, wie er in der Literatur beschrieben wird (95, 75, 94).
- ad 2): Es werden 800 mg Florisil verwendet, da durch die Ketodase 17 - KS und 17 - OHCS freigesetzt und beide Hormongruppen adsorbiert werden (s. Abschnitt B I: GC-Nachweis der 17 - KS im Eluat des Florisil-Cholestyramin-systems)
- ad 3): Das Cholestyramin ist ein Anionenaustauscher, ein "Polymerisat aus Styrol und Divinylbenzol mit aliphatisch gebundenen quartären Stickstoffgruppen". Es wird in Pulverform verwendet. Wegen des großen Quellvermögens kann man das Cholestyramin nicht wie das Florisil trocken in die Plastiksäulen füllen. Man muß das Cholestyramin vor dem Einfüllen nach folgender Methode quellen lassen: Man füllt einen Schliffenmeyerkolben zur Hälfte mit Wasser und gibt Cholestyramin in kleinen Mengen zu, bis es unter Umrühren fast das gesamte Wasser aufgesogen hat. Dies ist erreicht, wenn die zugesetzte Pulvermenge 1/6 der Wassermenge beträgt. Das überstehende Wasser wird abdekantiert, der Cholestyraminbrei ist zum Abfüllen in die Säulen fertig. Zum Abfüllen wird eine 1 ml Enzympipette verwendet, deren zulaufende Spitze bis zur Markierung abgeschnitten wurde. Mit der "stumpfen" Pipette lassen sich in reproduzierbarer Weise 0,1 bis 1,0 ml Cholestyramin aufziehen und in die

Säulen abpipettieren. Man setzt 0,5 ml Cholestyramin ein. Es bildet in der Plastiksäule einen 10 mm hohen Zylinder, der nach Arbeitsvorschrift weiterbehandelt wird. Vor jedem Abfüllen des Cholestyramins überzeuge man sich, daß der Brei mit Wasser gesättigt ist. Man füllt sonst zuviel ab, da der Brei eingedickt ist. Am besten den Brei vor jeder Bestimmungsserie frisch ansetzen. Will man einen schon angesetzten verwenden, Wasser dazugeben, bis es übersteht und nicht mehr aufgenommen wird. Dieses Wasser abdekantieren - das Cholestyramin ist wieder aufgefrischt.

ad 4): Es werden nur wenige ml Wasser verwendet, da das Wasser pro ml zu 1 % recovery-Verlust führt.

Nachweis:

Der Quenching-Faktor für 800 mg Florisil und für 0,5 ml Cholestyramin wurde mit  $^3\text{H}$ -Toluol bestimmt:

$f_Q$  Florisil = 2 (nur 50 % der zugesetzten IpM wurden gemessen)

$f_Q$  Cholestyramin = 1,25 (80 % der zugesetzten IpM wurden gemessen)

Der "Meßfehler" ist darauf zurückzuführen, daß das Florisil und das Cholestyramin den Boden der Packardgläser bedecken; der Meßkopf des Tricarb wird an den Boden herangeführt: der "Bodensatz" schluckt einen Teil der Impulse.

Zur Bestimmung der Radioaktivität, die im Durchlauf D, im Waschwasser W, im Florisil F, im Cholestyramin C und im Eluat E erscheint, wurden

0,6 ml D + Szintillator 10 ml

0,6 ml W + Szintillator 10 ml

F gesamt + 1 ml Äthanol abs. + 10 ml Szintillator

C gesamt + 1 ml Äthanol abs. + 10 ml Szintillator

0,1 ml Eluat + 0,9 ml Äthanol abs. + 10 ml Szintillator eingesetzt.

Verwendet wurde ein Patientenurin, Zusatz 600 000 IpM  $^3\text{H}$ -THF in 0,5 ml Äthanol abs. Nachwaschen der Florisilsäule vor der Elution mit 30 ml Wasser. Ergebnis (recovery in %).

D 6,7 %    W 31,0 %    F 1,0 %    C 12,5 %    E 43,5 %

(Die Originalmethode erreichte 44 % recovery im Extrakt). Das Nachwaschen war eine große Verlustquelle. Auch blieben im Cholestyramin 12,5 % der zugesetzten IpM. Trotzdem war die recovery gleich der mit der Originalmethode ermittelten.

ad 4): Zur Vereinfachung der manuellen Arbeit wurden Halteringe entwickelt, die es ermöglichen, ohne auf Halteapparate zurückgreifen zu müssen, zwei (und mehr) Plastiksäulen übereinander zu stecken (Abb. 4).

Die Säulendeckel der Plastiksäulen werden so gekerbt, daß der Rest des zulaufenden Trichters zwei Klappen bildet. Sie engen die Öffnung ein, die kleiner als der Durchmesser der Ausflußöffnung der Säulen ist. Mit geringem Kraftaufwand kann man die Ausflußöffnung durchzwängen; der kleine Sims an der Ausflußöffnung verhindert das Durchschlüpfen des unteren zulaufenden Säulenabschnittes durch die Klappen. Der Haltering wird an die Säule adaptiert, die als obere gedacht ist. Die mit dem Haltering versehene Säule wird auf die Einfüllöffnung der unteren Säule gesetzt.

ad 4): Bei Cholestyraminsäulen, die zu fest gepackt wurden, läuft das Eluat nicht durch. In solchen Fällen empfiehlt es sich, mit einem Ventilgummiball einen nicht zu großen, aber konstanten Druck auszuüben, bis das Eluat tropfenweise, dann immer schneller durchläuft.

ad 5): Zur Durchführung der PSR mit dem hormonhaltigen Eluat werden 2 ml verd. Schwefelsäure als Blankwertlösung und 2 ml einer Reagenzwertlösung verwendet.

#### Ansetzen der RW-Lösung:

Einen 200 ml Meßkolben mit 130 mg Phenylhydrazinkristallen beschicken und mit 200 ml verd. Schwefelsäure bis zum Messtrich füllen. Den Kolben in ein warmes Wasserbad setzen und ab und zu schütteln. Die Kristalle lösen sich vollständig; das Volumen der Lösung nimmt durch die Erwärmung zu. Eine Abkühlung in einem kalten Wasserbad, bei der das Phenylhydrazin gelöst bleibt, macht die Vo-

lumenzunahme rückgängig. Die gebrauchsfertige RW-Lösung im Kühlschrank aufbewahren! Dieses Vorgehen wurde im Januar 1970 entwickelt. Es erinnert an das von Sparagana et. al. (81) angegebene. Die Lösung nach Sparagana ist eine Woche haltbar, die RW-Lösung, die nach obigen Angaben erstellt wird, muß nur dann erneuert werden, wenn sie sich verfärbt.

### 3. Ergebnisse:

#### a, Stumme recovery:

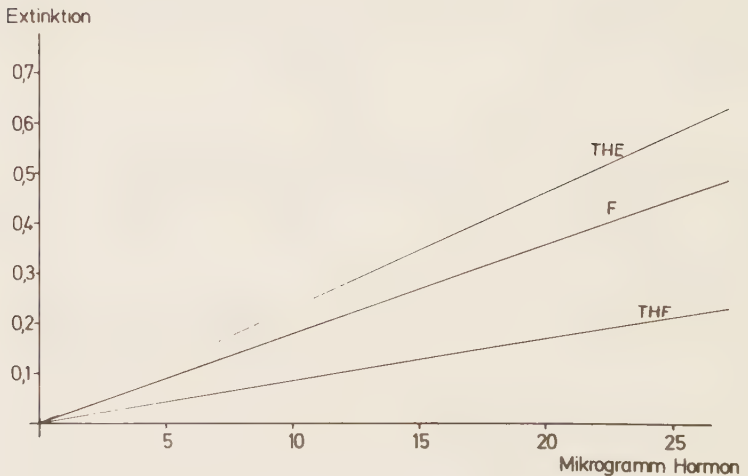


Abb. 5: Eichkurven für F, THF und THE

Zur Untersuchung der stummen recovery von F, THF, THE wurden die Reinsubstanzen in äthanolischer Lösung zu 10 ml Wasser gegeben und wie Urinproben extrahiert. An Hand der mit Reinsubstanzen aufgestellten Eichkurven (Abb. 5) wurden die den gemessenen Extinktionswerten entsprechenden Hormonwerte ermittelt.

Tabelle 6 zeigt die Wiederfindungsraten von F, THF und THE.

| SUBSTANZ   | Eingesetzte Menge in Mikrogramm | LW 0,040 BW | RW    | Diff. | Mikrogramm | x 5  | Stumme recovery |
|------------|---------------------------------|-------------|-------|-------|------------|------|-----------------|
| <u>F</u>   | 25                              | 0           | 0,095 | 0,055 | 3,2        | 16,0 | 64 %            |
|            | 25                              | 0           | 0,105 | 0,065 | 3,7        | 18,5 | 74 %            |
|            | 50                              | 0           | 0,170 | 0,130 | 7,5        | 37,5 | 75 %            |
|            | 50                              | 0           | 0,165 | 0,125 | 7,3        | 36,5 | 73 %            |
|            | 100                             | 0           | 0,335 | 0,295 | 17,2       | 86,0 | 86 %            |
|            | 100                             | 0           | 0,345 | 0,305 | 17,7       | 88,5 | 88,5 %          |
| <u>THF</u> | 25                              | 5           | 0,075 | 0,030 | 3,5        | 16,5 | 66 %            |
|            | 25                              | 5           | 0,075 | 0,030 | 3,5        | 16,5 | 66 %            |
|            | 50                              | 10          | 0,095 | 0,045 | 5,2        | 26,0 | 52 %            |
|            | 50                              | 10          | 0,105 | 0,055 | 6,3        | 31,5 | 63 %            |
|            | 100                             | 20          | 0,185 | 0,125 | 14,5       | 72,5 | 72,5 %          |
|            | 100                             | 25          | 0,205 | 0,140 | 16,3       | 81,5 | 81,5 %          |
| <u>THE</u> | 25                              | 0           | 0,110 | 0,070 | 3,0        | 15,0 | 60 %            |
|            | 25                              | 0           | 0,110 | 0,070 | 3,0        | 15,0 | 60 %            |
|            | 50                              | 0           | 0,180 | 0,140 | 6,0        | 30,0 | 60 %            |
|            | 50                              | 0           | 0,170 | 0,130 | 5,6        | 28,0 | 56 %            |
|            | 100                             | 0           | 0,345 | 0,305 | 13,1       | 65,5 | 65,5 %          |
|            | 100                             | 0           | 0,370 | 0,330 | 14,2       | 71,0 | 71,0 %          |

Tabelle 6: Stumme recovery von F, THF und THE

b, Recovery von  $^3\text{H}$  - THF ( radioaktive recovery )

Die  $^3\text{H}$  - THF recovery zeigte nach Bestimmung von 41 Werten ( Abb. 6 ) einen Mittelwert von 68,5 %.

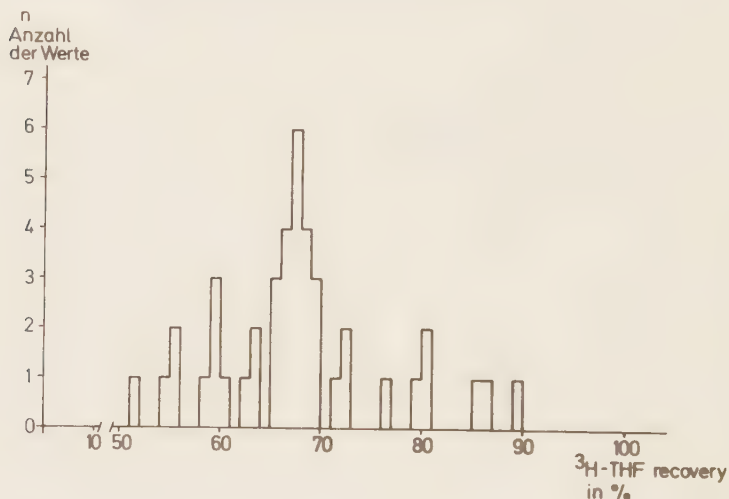


Abb. 6: Die Häufigkeitsverteilung der Wiederfindungsraten von  $^3\text{H}$  - THF

Bei der Durchführung der Originalmethode wurden folgende Werte der  $^3\text{H}$  - THF recovery ermittelt:

44 %, 28 %, 38 %, 33 %, 35 %, 36 %, 37 %, 36 %, 34 %, 36 %, 32 %.

Aus den Ergebnissen der Untersuchung der stummen recovery war ersichtlich, daß von den eingesetzten Reinsubstanzen das THF am schlechtesten aus wässrigen, d.h. polaren Lösungen extrahiert wird. Aus diesem Grunde war die Bestimmung der recovery von  $^3\text{H}$  - THF die aufschlußreichste.

c, Bestimmung des Kontrollurins K

(Sollwert 7,0 - 9,8 mg/24 h)

Mit der Originalmethode wurden 8,4 mg/24 h gefunden;

Mit der Flo/Chol - Methode wurden ermittelt:

| (LW 0,040) | BW/RW       | mg/24 h |
|------------|-------------|---------|
| K1         | 0,065/0,280 | 10,2    |
| K2         | 0,050/0,255 | 9,6     |

d, Nachweis von THF und THE mit der Tetrazoliumblaureaktion in dem nach der Florisil-Cholestyramin-Methode gewonnenen Eluat

Die Steroidhormone zweier Urinproben, denen je 600 000 IpM  $^3\text{H}$ -THF zugesetzt worden waren, wurden nach der Flo-Chol-Methode extrahiert. Beide Eluate, ein THF/ $^3\text{H}$ -THF Standard und ein THE-Standard wurden im Bush-B50-System chromatographiert. Mit der Tetrazoliumblaureaktion konnten in beiden Eluaten THF und THE nachgewiesen werden. Die in Scanner ermittelten Radioaktivitätspeaks stimmten mit den THF-Banden der entsprechenden Chromatogramme überein; die THF- und THE-Banden der Eluate der Urinproben stimmten mit den Banden der Standardlösungen überein. Abbildung 7 zeigt das Chromatogramm des Eluates einer Urinprobe.

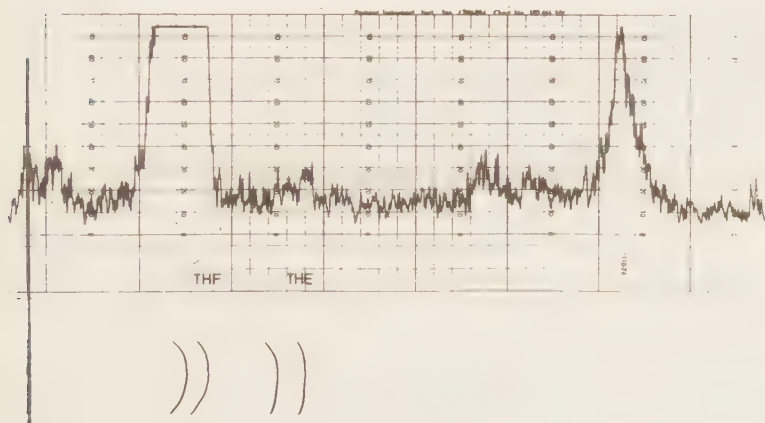


Abb. 7: Nachweis von THF und THE im Eluat einer Urinprobe mit der Tetrazoliumblau-reaktion

### e, Korrelanzuntersuchungen

Die Korrelanz zwischen den nach der Flo/Chol - Methode und den nach der Originalmethode gefundenen Werten betrug auf der Grundlage von 62 Wertepaaren ( Abb. 8 ) 0,913 .

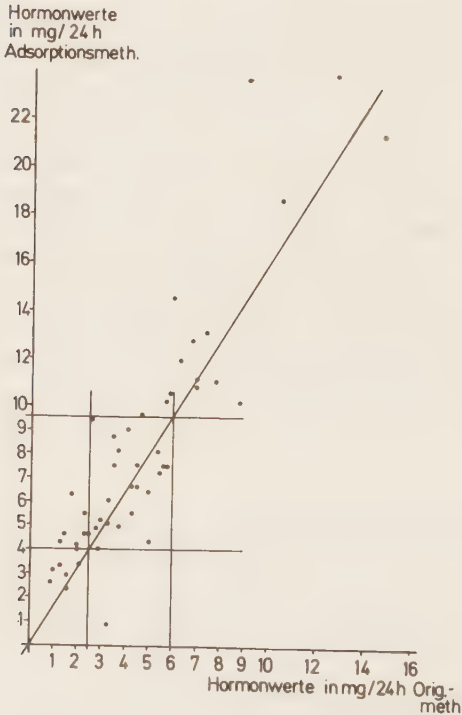


Abb. 8:

Die Korrelation zwischen den nach der Flo/Chol - Methode und den nach der Originalmethode gefundenen Werten. Die Verschiebung des Normbereiches ist in der Abbildung eingetragen.

Die nach der Flo/Chol - Methode gefundenen Werte lagen höher als die nach der Originalmethode ermittelten. Dies war im Hinblick auf die höhere recovery bei ersterer Methode zu erwarten.

f, Untersuchungen über die Blankwert/Reagenzwert - Beziehung bei den unter e, angeführten 62 Bestimmungspaaren

Die BW/RW-Beziehung gibt für die PSR einen Anhalt für den "Verschmutzungsgrad" der Proben. Je freier von unspezifischen Chromogenen eine Eluatprobe ist, um so kleiner ist der BW/RW-Quotient. Vertretbar ist ein Quotient von  $1/3$ . Ist er größer als  $1/2$ , ist die Probe in der Regel nicht genügend sauber: die grüngelben Porter-Silber-Chromogene werden von braungelben unspezifischen Chromogenen überlagert.

In 37 der 62 Fälle war der Quotient größer als  $1/3$ , in 7 der 37 Fälle war er größer als  $1/2$ .

g, Vergleich der Spezifität der PSR nach Extraktion gemäß der Originalmethode und nach Extraktion gemäß der Flo/Chol - Methode

Die LW/BW/RW - Extinktionen von Urinproben wurden in einem Bereich von 380 bis 450 nm Wellenlänge mit dem Beckmann - Spektralphotometer gemessen. Die spezifischen Extinktionen ergaben sich aus der Beziehung  $E_{\text{spez}} = RW - (BW + LW)$ .

Einigen Urinproben wurde zur Hervorhebung des Meßoptimums vor der Extraktion 50 Mikrogramm F zugesetzt. Der niedrigste Wert der BW - Kurven lag bei 410 nm, das Maximum der RW - Kurven ebenfalls bei 410 nm; damit lag das Maximum für die als Differenzwert errechnete  $E_{\text{spez}}$  bei 410 nm ( Abb. 9 ).

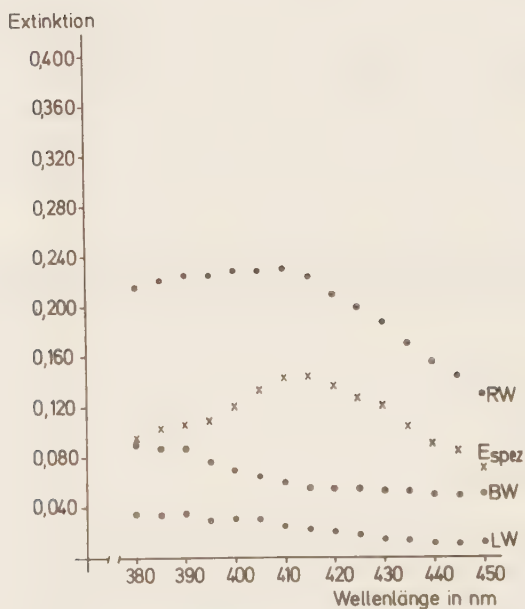


Abb. 9: Extinktionsspektrum einer nach der Flo/Chol-Methode extrahierten Urinprobe, der vor der Extraktion 50,0 Mikrogramm F zugesetzt worden waren

Die Befunde galten für alle Proben, sowohl für die nach der Originalmethode als auch für die nach der Flo/Chol-Methode extrahierten.

Das Meßoptimum lag bei 410 nm, d.h. bei der Wellenlänge, bei der das Extinktionsmaximum des Cortisols gemäß der Porter-Silber-Reaktion zu erwarten war ( Abb. 10 ).

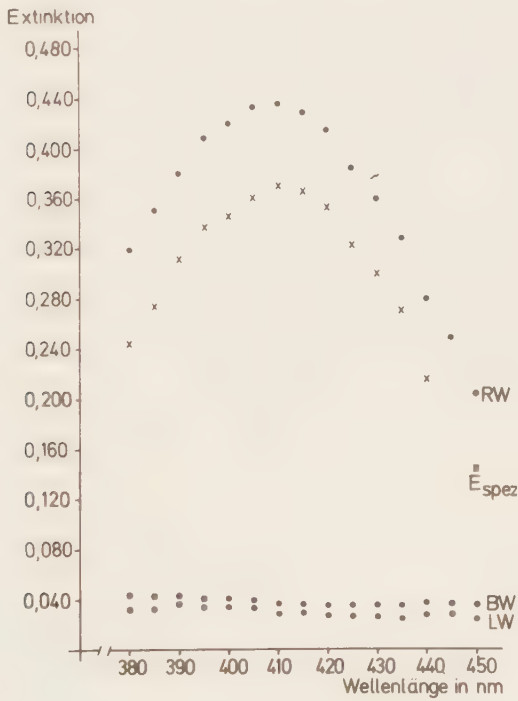


Abb. 10: Extinktionsspektrum der Reinsubstanz F  
( eingesetzte Menge 20 Mikrogramm )

#### 4. Diskussion der Ergebnisse

- a, Die stumme recovery für F/THE/THF betrug 76,8 % / 66,8 % / 62,1 %.
- b, Die radioaktive recovery (von  $^3\text{H}$ -THF) betrug im Mittel 68,5 % und war damit größer als die mit der Originalmethode gefundenen von 35,4 % (Mittelwert).
- c, Die Kontrollurinbestimmung ergab mit 9,6 und 10,2 mg/24 h Werte im oberen Bereich der Norm (7,0 - 9,8 mg/24 h).
- d, Mit der Tetrazoliumblaureaktion konnten in Eluaten THF und THE nachgewiesen werden. Die in Scanner ermittelten Radioaktivitätspeaks stimmten mit den Farbbanden der entsprechenden Chromatogramme überein.
- e, Die Korrelanz zwischen Flo/Chol-Methode und Originalmethode war mit 0,913 gut. Wie nach a, zu erwarten war, lagen die mit der Flo/Chol-Methode gefundenen Werte höher.
- f, Der Reinheitsgrad der Proben befriedigte: in 37 von 62 Fällen war der BW/RW-Quotient größer als 1/3, aber nur in 7 der 37 Fälle größer als 1/2.
- g, Die Spezifitätsuntersuchung erbrachte für die Flo/Chol-Methode und für die Originalmethode gleiche Spezifität.

Die Extraktion der 17 - OHCS nach der Flo/Chol - Methode ist, kombiniert mit der PSR, e i n f a c h e r und s c h n e l l e r als die Originalmethode. Das mehrmalige Zentrifugieren fällt weg, es werden k e i n e t o x i - s c h e n S u b s t a n z e n wie Chloroform benötigt.

B, Adsorption an Florisil und gaschromatographischer Nachweis der 17 - KS und der 17 - OHCS

BI. Gas-chromatographischer Nachweis der 17 - KS in dem nach der Florisil-Cholestyramin-Methode gewonnenen Eluat

1. Arbeitsvorschrift:

1) Gewinnung des trockenen hormonhaltigen Rückstandes: 1 ml eines jeden Eluates unter  $N_2$ -Strom einengen, bis das Äthanol vollständig abgeblasen ist. Aus dem trockenen Rückstand die Hormone mit redest. Diäthyläther in Eppendorfgeläße überführen, den Äther mit  $N_2$ -Strom abblasen.

2) Silylierung: die Hormone in 0,2 ml redest. Chloroform aufnehmen, 0,2 ml HMDS und 0,05 ml TMCS zusetzen. Über Nacht bei Raumtemperatur oder 1 h bei  $60^\circ C$  stehen lassen. Unter  $N_2$ -Strom abblasen, den Rückstand in 50 Mikroliter redest. Isooctan lösen und mit einer Hamiltonspritze 2-5 Mikroliter in den GC einspritzen.

3) GC-Bedingungen:

1 % XE 60 - Säule

Säulentemperatur  $T = 195^\circ C$  ( konstant )

$N_2$ -flow ( carrier )  $\approx 12$  psi

$H_2$ -flow = 40 ml/min

$O_2$ -flow = 200 ml/min

Buckout  $10^{-9}$ ; meter range  $3 \times 10^{-10}$ ; Schreibgeschwindigkeit 1 inch/5 min.

Internal standard ( wird vor dem Inkubieren zugesetzt ):

50 Mikrogramm DHT.

4) Berechnung der Hormonmengen: Sie erfolgt nach Messung der Peakhöhen nach der Formel

$$\text{Menge an Hormon x} = \frac{h_{\text{E Hormon x}}}{h_{\text{E DHT}}} \cdot \frac{h_{\text{STD DHT}} \cdot \text{Mikrogramm zuge- setztes DHT}}{h_{\text{STD Hormon x}}}$$

$h_{\text{E Hormon x}}$  = Peakhöhe des zu bestimmenden Hormons im Chromatogramm des untersuchten Extraktes E

$h_{\text{E DHT}}$  = Peakhöhe des zugesetzten DHT im Chromatogramm des untersuchten Extraktes E

$h_{\text{STD DHT}}$  = Peakhöhe des DHT im Chromatogramm des Standardgemisches STD

$h_{\text{STD Hormon x}}$  = Peakhöhe des zu bestimmenden Hormons x im Chromatogramm des Standardgemisches STD

## 2. Diskussion der Methode

a, Die A d s o r p t i o n von Steroidhormonen an Florisil wurde zur Aufbereitung von Urinproben für die Gaschromatographie der 17 - KS eingesetzt (95, 75). Dabei wurde zum Reinigen der Eluate der Florisilsäule bei der Elution eine  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule nachgeschaltet.

In den folgenden Ausführungen wird auf diese Methode Bezug genommen. Die Angabe der genauen Arbeitsvorschrift dient dem besseren Verständnis.

### Arbeitsvorschrift für die Florisil- $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode:

1. Für jede Urinprobe eine Pasteurpipette mit Glaswatte als Fritte versehen, in ein Gestell stellen, das zwei Pasteurpipetten übereinander halten kann, und mit einem Löffelchen (400 mg Florisil) beschicken.

2. Die obere Öffnung der Pasteurpipette mit einem Gummistopfen verschließen. An eine 20 ml - Einmalspritze ohne Stempel eine Nadel Nr. 2 adaptieren, die Nadel durch den Gummistopfen stechen - die Spritze schwebt über der Pasteurpipette.

3. In die 20 ml - Einmalspritze die Urinprobe füllen, die tropfenweise die Säule durchläuft. Nachgefüllt werden 2 ml 2 n NaOH zum Entfernen störender Verunreinigungen und 10 ml Wasser zum Ausspülen des Systems. Der Durchlauf wird verworfen.

4. Die Spritze mit Nadel und Gummistopfen von der Pipette entfernen.

5. Eine zweite Pasteurpipette mit Glaswatte bestücken und mit 400 mg trockenen  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Aktivitätsstufe II - III, beschicken. Diese Pipette unter die erste stellen. Ein 10 ml Serumglas zum Auffangen des Eluates bildet das unterste Stockwerk des dreistöckigen Elutionssystems (Abb. 11).

6. Man eluiert die an Florisil adsorbierten Hormone sowie Fremdstoffen mit 5 x 1 ml Äthanol abs. Die folgende  $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Säule hält die Verunreinigungen zurück, während die Hormone passieren. Das Eluat ist klar und kaum gefärbt.

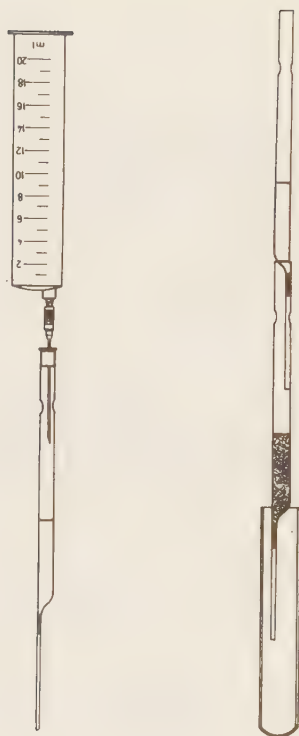


Abb. 11:  
Adsorptionssystem  
(linke Bildhälfte)  
und Elutionssystem  
(rechte Bildhälfte)  
zur Gewinnung der  
17 - KS aus Urin-  
proben nach der  
Florisil- $\text{Al}_2\text{O}_3$ -  
Methode

- b, Die gas-chromatographische Analyse der 17 - KS als TMSi-Äther ist wohlfundiert. Sie wurde wenige Jahre nach den ersten gas-chromatographischen Untersuchungen von Steroiden und Steroidhormonen (37, 20, 4, 82, 84, 86, 16, 30, 59) entwickelt (61, 64, 65, 87, 34, 38, 35, 25, 31, 32); dabei wurde den Urin-17 - KS besondere Beachtung geschenkt (79, 55, 93). In diesem Zusammenhang muß auch die bei Silylierungsreaktionen häufig angewandte Methode von Makita/Wells (67) erwähnt werden, die auf den Einsatz von Pyridin/HMDS/TMCS 9/3/1 beruht. Wie VandenHeuvel WJA zeigen konnte (90), zerstört das Pyridin, da es mit der Entstehenden HCl reagiert, das Reaktionsgleichgewicht und verschiebt es auf die Seite der Silylierung.

Zusammenfassende Darstellung der GC der 17 - KS und der Plasmaandrogene sind in Tagungsberichten und Übersichten niedergelegt (38; 39, 62, 88, 60, 74, 21, 73, 96).

### 3. Ergebnisse

- a, Untersuchung des Verhaltens von Hormonmustern bei der Extraktion von hormonhaltigen wässrigen Lösungen nach der Flo/Chol - Methode

Ein Standardgemisch mit dem Hormonmuster Andro, Ätio, DHT 1/1/1

und

ein Standardgemisch mit dem Hormonmuster Andro, Ätio, DHEA, DHT, 11-OH-Andro, 11-Keto-Andro

als "Sechs-Hormonstandard" 1/1/1/1/1/1

wurden auf Verschiebung der Relationen nach Extraktion gemäß der Flo/Chol-Methode geprüft.

Von jedem Gemisch wurde eine bestimmte Menge für jede Probe verwendet; jede Probe enthielt 50 Mikrogramm eines jeden Hormons. Je zwei Proben wurden direkt silyliert, zwei Proben in 10 ml Wasser gelöst und nach der Flo/Chol-Methode, zwei Proben nach der Florisil-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Methode extrahiert.

Abb. 12 zeigt die Gas-Chromatogramme des 3- und des 6-Hormonstandards, die direkt silyliert wurden,

Abb. 13 die Gas-Chromatogramme der Proben mit 3 Hormonen,

Abb. 14 die Gas-Chromatogramme der Proben mit 6 Hormonen, die nach der Florisil-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>- bzw. nach der Flo/Chol-Methode extrahiert wurden.

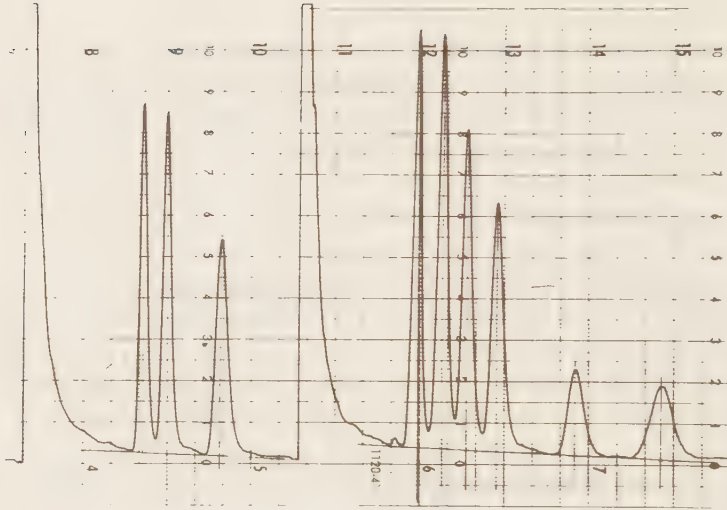


Abb. 12: Gas-Chromatogramm des 3-Hormone-Standards Andro/  
Ätio/DHT (von links nach rechts) und des 6-Hormo-  
nestandards Andro/Ätio/DHEA/DHT/11-OH-Andro/11-  
Keto-Andro (von links nach rechts)

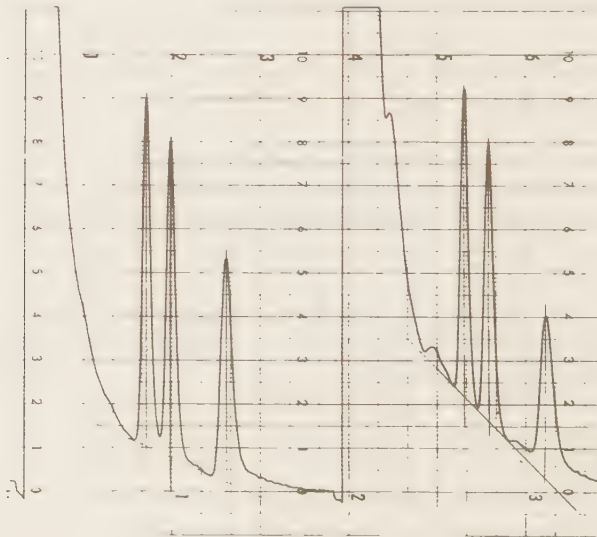


Abb. 13: Gas-Chromatogramm der Eluate der Proben mit 3  
Hormonen.  
Links: Eluat des Florisil-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Systems  
Rechts: Eluat des Flo/Chol-Systems

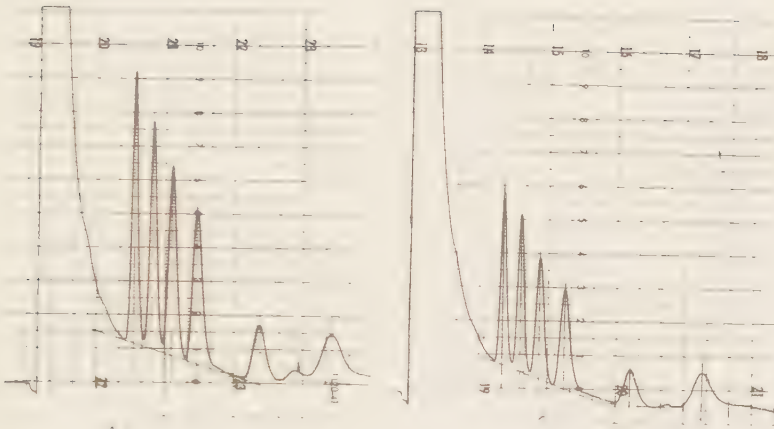


Abb. 14: Gas-Chromatogramm der Eluate der Proben mit 6 Hormonen.

Links: Eluat des Florisil-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Systems

Rechts: Eluat des Flo/Chol-Systems

b, Klinische Anwendung der Flo/Chol-Methode mit gas-chromatographischem Nachweis der 17 - KS.

Man verfolgte einen Monat lang (mit einer Unterbrechung von einer Woche) die 17 - KS - Ausscheidung eines Patienten mit einer NNR-Hyperplasie. In

Abb. 15 sind die gefundenen Werte für Andro, Ätio und DHEA als Monatsprofil eingetragen.

Abb. 16 und 17 zeigen die Gas-Chromatogramme der Sammelurine zweier verschiedener Tage.

(Methode wie beschrieben: Internal standard 50 Mikrogramm/Urinprobe, d.h. 50 Mikrogramm pro 1/200 TM.  
GC-Bedingungen und Berechnung wie schon beschrieben.)

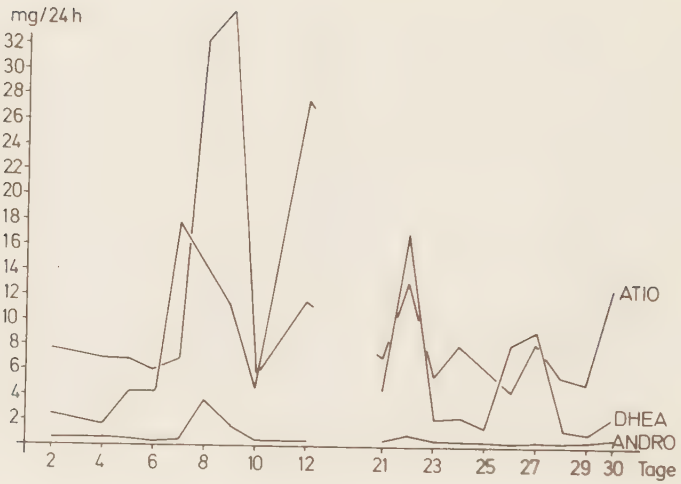


Abb. 15: Ausscheidung von Andro, Ätio und DHEA bei einem Patienten mit NNR-Hyperplasie (Monatsprofil)

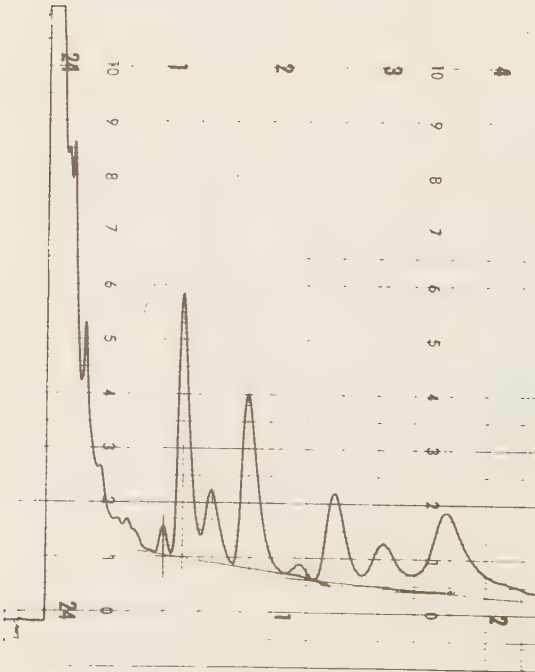
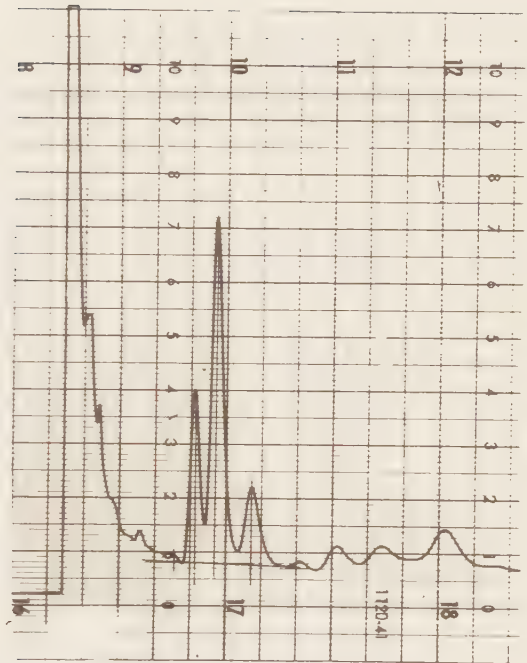


Abb. 16: Gas-Chromatogramm der Urinprobe des 1. Tages

Abb. 17: Gas-Chromatogramm der Urinprobe des 9. Tages



#### 4. Diskussion der Ergebnisse

a, Die Relation Andro/Ätio war nach dem Einsatz der Flo/Chol - Methode dieselbe wie nach Durchlauf der Proben durch das Florisil- $\text{Al}_2\text{O}_3$ -System:

|                              | Probe 1    | 2          | 3          |
|------------------------------|------------|------------|------------|
|                              | Andro/Ätio | Andro/Ätio | Andro/Ätio |
| Flo/Chol                     | 1,04       | 1,10       | 1,09       |
| Flo/ $\text{Al}_2\text{O}_3$ | 1,08       | 1,18       | 1,08       |

Aus den Kurven des 3 - Hormonestandards war ersichtlich, daß das Cholestyramin keinen "Geisterpeak" beisteuert, der die Retentionszeit des DHEA besitzt; aus den Kurven des 6 - Hormonestandards war zu erkennen, daß alle 6 Hormone gut getrennt werden.

b, Die Chromatogramme, die im Rahmen der klinischen Anwendung der Adsorptionsmethode erhalten wurden, zeigten, daß neben Andro, Ätio, DHEA, DHT als STD, 11-Keto-Andro, 11-OH-Andro ( = Peaks Nr. 1, 2, 3, 4, 6, 8 ) auch andere Peaks auftraten (Nr. 5, 7; 9). Peak 9 trat in wenigen Gas-Chromatogrammen auf. In der Abb. 16 ist er gar nicht vorhanden, in der Abb. 17 ganz leicht angedeutet. Ein Vergleich mit den von Kirschner, Lipsett, Collins (56) über eine 2 % XE 60-Säule und von Ruchelmann (77) über eine 4 % XE 60-Säule gewonnenen Chromatogramme erhärtete die Vermutung, Peak 5 könnte Pregnantriol sein (adrenales; der Patient war von männlichem Geschlecht), Peak 7 11-Keto-Ätio, Peak 9 11-OH-Ätio.

Die Flo / Chol - Methode ist als Methode zur Aufbereitung von Urinproben für die GC der 17 - KS geeignet, da die Relationen der Hormonmengen nicht verschoben werden, keine "Geisterpeaks" entstehen und die Proben genügend sauber sind.

Folgende Hormone wurden getrennt:

Andro, Ätio, DHEA, DHT-internal standard, (Pregnantriol), 11-Keto-Andro, (11-Keto-Ätio), 11-OH-Andro, (11-OH-Ätio). Besonders hervorzuheben ist die Tatsache, daß zum Nachweis der 17 - KS in dem nach der Flo/Chol-Methode gewonnenen Eluat nur 1 ml des betreffenden Eluates benötigt wird. Mit dem Gas-Chromatographen werden  $1/200 \times 1/5 \times 5/50 = 1/10\ 000$  der Tagesmenge der 17 - KS nachgewiesen. (1/200 TM wird als Urinprobe angesetzt, 1/5 des Eluates für die Gas-Chromatographie aufbereitet, 5/50 der Isooctanlösung, in der die silylierten Steroidhormone enthalten sind, werden auf die Säule gebracht.) Nimmt man für die 17 - KS den Normbereich 10-20 mg/24 h an, so ergibt sich, daß 1,0 - 2,0 Mikrogramm eines Hormongemisches nachgewiesen und quantitativ aufgeschlüsselt werden.

B II. Gaschromatographischer Nachweis der 17 - OHCS in dem  
nach der Florisil-Cholestyramin-Methode gewonnenen  
Eluat

1. Arbeitsvorschrift:

1) Gewinnung des trockenen hormonhaltigen Rückstandes:  
Die Eluate (alle 5 ml) unter  $N_2$ -Strom einengen, bis das  
Äthanol vollständig abgeblasen ist.

2) Bildung der MO-Derivate:

Zu jeder Probe 0,5 ml einer Methoxamin-hydrochlorid-Lö-  
sung (16 mg/ml) geben (die MO-Lösung in einem Packard-  
glas vorher ansetzen, 160 mg MO-Salz in 10 ml redest.  
Pyridin), für 60 min in einen Inkubator bei  $60^{\circ} C$  stel-  
len.

3) Gewinnung der MO-Derivate:

Mit  $N_2$  das Pyridin abblasen. Am Boden des Eppendorfg-  
efäßes bildet sich ein gelartiger weißlicher Nieder-  
schlag. Auf den Niederschlag 1,0 ml redest. Isooctan ge-  
ben, Eppendorf-Gefäß gut verschließen, Inhalt 2 min in  
der Eppendorf-Schüttelmaschine aufschütteln, 3 min in  
der Eppendorf-Zentrifuge zentrifugieren, überstehende  
Lösung abpipettieren, in ein anderes Eppendorf-Gefäß  
überführen, Isooctan mit  $N_2$  abblasen.

4) Silylierung:

Auf den Rückstand 0,2 ml redest. Pyridin  
0,2 ml BSA  
0,1 ml TMCS geben,  
über Nacht bei  $60^{\circ} C$  inkubieren.  
Die Silylierungslösung färbt sich gelb.

5) Gewinnung der MO-TMSi-Äther:

Silylierungslösung mit  $N_2$  abblasen, auf den Rückstand 0,05 ml redest. Isooctan geben, 2 min in der Schüttelmaschine schütteln, 3 min zentrifugieren. Von der überstehenden klaren Lösung 5 Mikroliter in den Gaschromatographen spritzen.

6) GC-Bedingungen:

1 % XE 60'-Säule (es handelt sich um eine "selektive" Säule) Säulentemperatur  $T = 195^\circ C$  (konstant)

$N_2$ -flow (carrier)  $\hat{=}$  30 psi

$H_2$ -flow = 40 ml/min

$O_2$ -flow = 200 ml/min

Buckout  $10^{-9}$ ; meter range  $3 \times 10^{-10}$ ; Schreibgeschwindigkeit 1 inch/5 min.

2. Diskussion des gas-chromatographischen Nachweisverfahrens für die 17 - OHCS

a, Bemerkungen zur Methodik:

ad 2): Die MO - Derivate wurden gemäß den Angaben von Fales und Luukkainen (23), Horning et al. (47) und Chambaz et al. (12) gebildet.

ad 4): Die Wahl der Silylierungsverhältnisse richtete sich nach den von Chambaz und Horning (11, 14) veröffentlichten Untersuchungen.

ad 1) und 5): Es muß jeweils das gesamte Eluat verarbeitet werden. In den 5 ml des äthanolischen Eluates ist 1/200 der Tagesmenge TM enthalten. 5/50 der hormonhaltigen Isooctanlösung, d.h. 1/2 000 TM, werden in den Gas-Chromatographen gespritzt. Nimmt man einen Wert von 4 mg/24 h (untere Normgrenze nach der Flo/Chol-Methode) an, so sind in 1/2 000 TM 2 Mikrogramm 17 - OHCS; dabei handelt es sich nach Neher (71) um

|        |         |                |
|--------|---------|----------------|
| 29,7 % | = 0,594 | Mikrogramm THF |
| 50,0 % | = 1,0   | Mikrogramm THE |
| 3,2 %  | = 0,064 | Mikrogramm F   |

Optimal ist es, 1/1 000 TM auf die Säule des Gas-Chromatographen zu bringen (21). Dies ließe sich dadurch erreichen, daß eine Urinprobe doppelt angesetzt und extrahiert wird. Es müßten 10 ml äthanolischen Eluates eingeengt werden: das Abblasen dauert lange, kostet viel  $N_2$  und verursacht die Zunahme der im Rückstand enthaltenen Verunreinigungen. Es ist daher nicht durchführbar.

ad 2), 4) und 5): Die MO-Derivate und die MO-TMSi-Derivate sind schwer aus dem gelartigen Niederschlag zu gewinnen. Die dabei eintretenden Verluste führen dazu, daß die Menge der in Wirklichkeit in die Gas-Chromatographie-Säule eingebrachten Hormone kleiner als 1/2 000 TM ist.

ad 6):  $N_2$ -flow  $\hat{=}$  30 psi gemäß Eik-Nes und Horning (21).

b, Bemerkungen zur einschlägigen Literatur:

Die Corticosteroide, zu denen die 17 - OHCS gehören, erwiesen sich im Gegensatz zu den Androgenen bei der GC als labil: sie verloren ihre Seitenkette (85, 87, 88). Zur Umgehung dieser Schwierigkeit wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen verschiedene Wege eingeschlagen.

Auf der einen Seite ging man daran, die CS gezielt in die entsprechenden stabileren 17 - KS zu verwandeln (in die sogenannten 17-oxogenicsteroids). Luestscher und Gould (63), Crane und Harris (17) versuchten die Bruchstücke im Gas - Chromatographen zu bestimmen und mit ihnen indirekt die CS, doch die Methode war nicht quantitativ. Erfolgreicher war die Reduktion der CS mit Borhydrid und anschließender Oxydation mit Perjodat (Merits (69): Oxydation mit Perjodsäure; Kittinger (57) idem). Bailey (1, 2), Sparagana (80), Menini/Norymbersky (68), Murphy und West (70) arbeiteten diese Reduktion-Oxydationsmethode aus, wobei Bailey hervorzuheben (3) ist. Die Methode wird heute noch vielfach eingesetzt (66, 58).

Andere Teams suchten nach stabilen Derivaten der CS: Kirschner und Fales (54) untersuchten die Bismethylenedioxy-Derivate, Brooks acetylierte CS (7); Rosenfeld (76) bildete mit Erfolg die TMSi-Derivate der Cortole und Cortolone, nicht aber der Tetrahydroverbindungen.

Die ausschlaggebende Untersuchung war die Bildung der O-Methyl-Oxime (der sog. MO-Derivate) durch Fales und Luukkainen 1965 (23). Sie verwendeten zur Identifizierung und zur genauen Analyse der Reaktionsprodukte den Massenspektrometer nach Ryhage (78). Die MO-Derivate waren nicht stabil, ließen sich aber silylieren (Gardiner und Horning (29), ohne daß die Seitenkette der CS bei der GC verloren ging. Zum ersten Male konnten Tetrahydroverbindungen der CS gaschromatographisch untersucht werden (29, 28). Horning, Brooks, Chambaz, Gardiner u.a. bemühten sich um die Ausarbeitung der Methode zur Bildung der MO-TMSi-Derivate der CS.

Ein weiterer Schritt war die Einführung des BSA (5) durch Klebe/Finkbeiner/White (53) und Horning (42). In der Folgezeit wurden mannigfache Untersuchungen durchgeführt. Hara et al. (33) und Horning et al. (47) analysierten die syn-anti-Typen der MO-Isomere. Brooks und Harvey (9) studierten die Oxime der 20-Oxosteroide, Dray und Weliky die Kinetik der MO-Reaktion (19), Chambaz (12) die Enoltrimethylsilyläther. Horning (42) und Chambaz (11, 14) klärten das Reaktionsverhalten von Steroidhormonen bei katalysierter und nicht katalysierter Silylierung. Vanden-Heuvel, Gardiner und Horning bestimmten die Retentionszeiten silylierter Steroide für verschiedene Säulen (89); Vanden-Heuvel, Patterson und Braly bildeten die MO-TMSi-Derivate von 17-alpha-hydroxyprogesteron und 17-alpha-hydroxypregnenolon (91), Horning und Chambaz (43, 13) die der Harnsteroiden Neugeborener. Man setzte die BSA-Lösung auch zur Silylierung von Plasma- und Urinsäuren ein (45, 46) und bildete die MO-Derivate des Aldosterons (44).

Gleichzeitig zu der Flut der Einzeluntersuchungen erschienen auch zusammenfassende Berichte (41, 40, 8, 92), die

die neue Methode zur Methode der Wahl zur Bildung stabiler Derivate der CS erklärten, so Horning et al. (74), Eik-Nes und Horning (21). E.A. Pierce (73) bezog sich in seinem Bericht, daß silylierte MO-Derivate der CS bei der GC auf einer 1 % SE 30-Säule stabil sind, auf die Arbeiten des Teams von Gardiner und Horning (29, 28).

Wotiz und Clark (96) behaupteten jedoch, es sei keine Methode aufgezeigt worden, "bei der die intakten Moleküle der CS der GS-Analyse unterworfen wurden" - mit Ausnahme der GC-Analyse der Cortole und Cortolone (76). Sie empfahlen die Oxydation zu den entsprechenden 17 - KS nach Bailey (3) und Kittinger (58).

Die Bemühungen anderer Arbeitsgruppen scheinen ebenfalls dafür zu sprechen, daß die GC der CS nicht so einfach wie die der 17 KS ist: Kelly bildete mit Dimethyldiacetoxysilan Siliconide der CS und erhielt stabile Derivate (50, 51, 52). Van Kampen und Mitarbeiter entwickelten eine Methode, die unter Umgehung der Bildung komplizierter Derivate eine schnelle Aufstellung von Urinprofilen für die klinische Diagnostik ermöglichte: es wurden 17 - KS und "17-ketogenic steroids" erfasst (49, 36, 26). Dabei konnten bestimmten endokrinen Funktionsstörungen bestimmte Profilbilder zugeordnet und eine Sammlung charakteristischer Urinprofile aufgestellt werden, mit denen unbekannte Urinprofile durch Vergleich deutbar wurden.

Chambaz und Madani (15) nahmen eine Mittelstellung ein. Sie schrieben, daß " die Darstellung der CS und der Androgene in Urinprofilen möglich" sei, "die Methode jedoch einer technischen Vereinfachung" bedurfe, da "der Erfolg zu sehr von spezieller Erfahrung abhängig" sei. Zudem "erfordere die Charakterisierung der erscheinenden Peaks die Kombination GC/Massenspektrometer". Als geeignete Derivate der CS für die GC böten sich die MO-TMSi-Äther an.

### 3. Ergebnisse:

a, Es konnten THF, THE und F nachgewiesen werden. Die Abbildungen 18, 19 und 20 zeigen die Peaks der Reinsubstanzen, die Abbildung 21-die Trennung eines THF/THE/F - Gemisches. Die äthanolischen Lösungen der Reinsubstanzen wurden nach der beschriebenen Methode behandelt. Eingesetzt waren jeweils 50 Mikrogramm eines jeden Hormons, 5 Mikroliter von 50 wurden in den Gas-Chromatographen gespritzt.

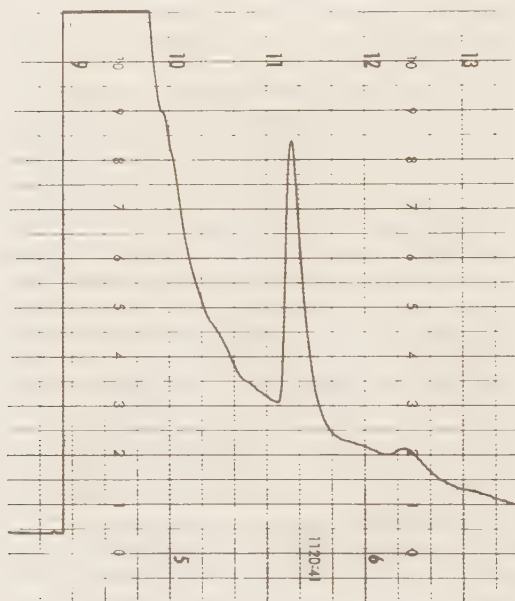


Abb. 18: Gas-Chromatogramm der Reinsubstanz THF  
(Nachweis von umgerechnet 1 Mikrogramm,

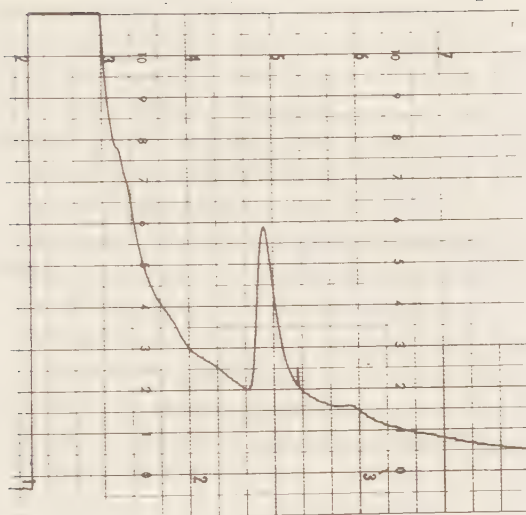


Abb. 19: Gas-Chromatogramm der Reinsubstanz THE  
(Nachweis von umgerechnet 1 Mikrogramm)

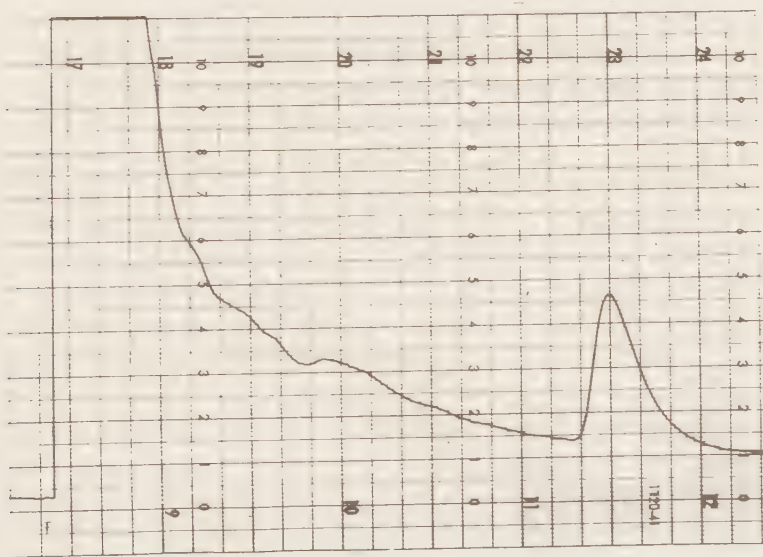


Abb. 20: Gas-Chromatogramm der Reinsubstanz F  
(Nachweis von umgerechnet 1 Mikrogramm)

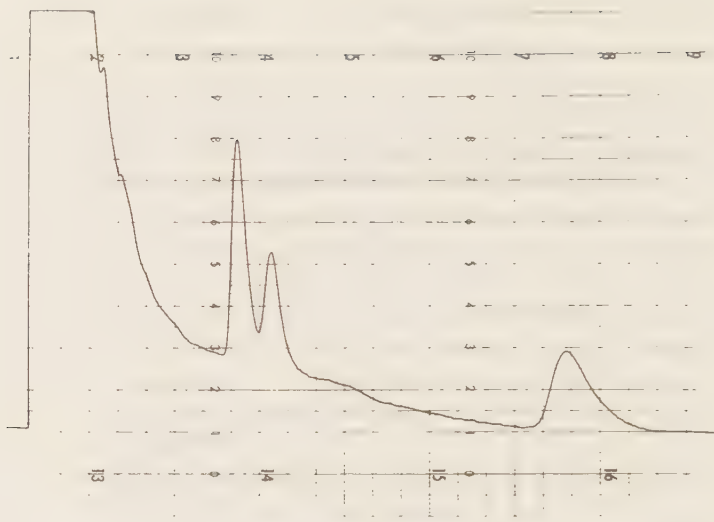


Abb. 21: Gas-Chromatogramm eines Gemisches der Reinsubstanzen THF, THE und F  
(Nachweis von umgerechnet je 1 Mikrogramm)

b, Abb. 22 zeigt das Gas-Chromatogramm der 17-OHCS eines nach der Flo/Chol-Methode gewonnenen Eluates einer Urinprobe.

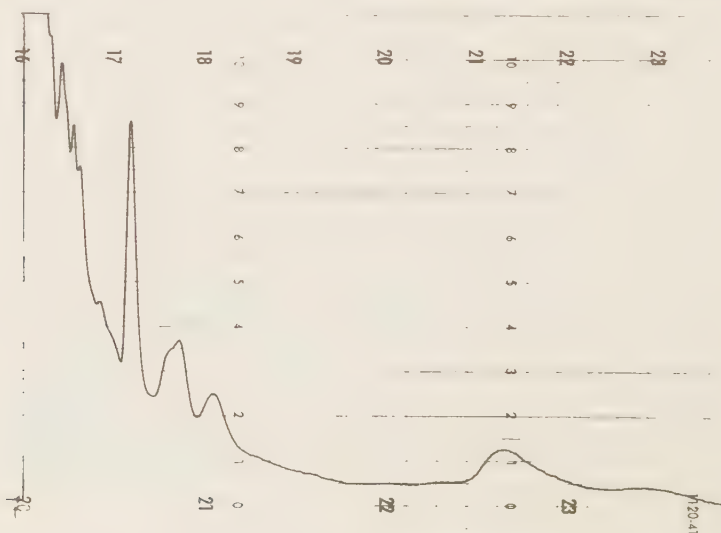


Abb. 22: Gas-Chromatogramm der 17-OHCS eines nach der Flo/Chol-Methode gewonnenen Eluates einer Urinprobe

#### 4. Diskussion der Ergebnisse

ad a, und b,: Trotz der großen Lösungsmittelpeaks wurden die Reinsubstanzen gut getrennt. THF erschien vor THE im Gegensatz zu den veröffentlichten Diagrammen (29, 28). Dies war darauf zurückzuführen, daß eine im Vergleich zur 1 % SE 30 Säule, die zur Erstellung der veröffentlichten Diagramme verwendet worden war, selektive 1 % XE 60-Säule eingesetzt wurde (92). Diese Beobachtung stimmte mit den Retentionszeitenangaben überein, die Chambaz und Horning (11) niedergelegt haben: auch bei ihnen erschienen auf der nicht selektiven OV 1-Säule die THE-20-MO-Derivate vor den THF-20-MO-Derivaten, auf der selektiven OV 17-Säule aber die THF-Derivate vor den THE-Derivaten.

ad b: In der Urinprobe konnten durch Vergleich der Retentionszeiten THF, THE und F ermittelt werden. Der Peak nach dem THE blieb unbekannt, unerklärt die Abnahme der Retentionszeiten der einzelnen Hormone im Gas-Chromatogramm des Hormongemisches (Abb. 21) und der Urinprobe (Abb. 22). Die Verluste bei der Gewinnung der MO-TMSi-Äther brachten es mit sich, daß nur Urinproben von Patienten mit erhöhter 17 - OHCS - Ausscheidung zur Gas-Chromatographie der 17 - OHCS herangezogen werden konnten.

Der gas-chromatographische Nachweis der 17 - OHCS gelang zwar, blieb jedoch nur qualitativ. Die 17 - OHCS konnten nicht wie die 17 - KS aufgeschlüsselt und quantitativ erfaßt werden. Die Hauptschwierigkeit lieferte der gelartige Niederschlag. Auch Engel und Mitarbeiter (22) hatten "gelbe Beiprodukte, die das Reaktionsgemisch für flüssige wie feste GC-Injektionstechnik ungeeignet machen, wenn nur kleine Steroidmengen untersucht werden". Sie leiteten das Reaktionsgemisch über eine Sephadexsäule, eluierten es, dampften das Elutionsmittel ab, silylierten erneut in BSA/Pyridin-Atmosphäre und brachten die Proben mit einem solid-injector in den GC. Identifizierung der Peaks erfolgte mit einem Massenspektrometer - alles in allem eine aufwendige Methode, die als Routinemethode nicht geeignet ist.

### C. Mögliche Kombinationen der vier Nachweismethoden

I. Das mit der unter BI beschriebenen Methode gewonnene Eluat (zur colorimetrischen Bestimmung der 17 - KS nach Zimmermann) ist sowohl zur colorimetrischen als auch zur gaschromatographischen Bestimmung der 17 - OHCS nicht brauchbar, da durch die HCl-Hydrolyse die 17 - OHCS zerstört werden.

II.1. Die Möglichkeit, das mit der Flo/Chol-Methode gewonnene Eluat für den colorimetrischen Nachweis der 17 - KS zu verwenden, scheiterte an der Trübung des Eluates beim Kontakt mit der 3 n KOH, die für die Zimmermann-Reaktion nötig ist.

2. Ein Waschen der Florisilsäule mit einer Lauge unter Verzicht auf die Cholestyraminsäule - ein durchaus naheliegendes Vorgehen - machte den Nachweis der 17 - OHCS im Eluat unmöglich, da die 17 - OHCS alkaliempfindlich sind. Selbst bei Verwendung von 0,1 n NaOH konnten die 17 - OHCS nicht zuverlässig nachgewiesen werden:

| Proben-Nr. | Unter Verwendung von<br>0,1 n NaOH gefundener<br>Wert in mg/24 h | Nach der Original-<br>methode gefundener<br>Wert in mg/24 h |
|------------|------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------|
| 1          | 1,2                                                              | 4,7                                                         |
| 2          | 1,2                                                              | 3,5                                                         |
| 3          | 3,8                                                              | 12,2                                                        |
| 4          | 5,5                                                              | 15,0                                                        |
| 5          | 7,5                                                              | 8,8                                                         |

3. Aus 1. und 2. ergab sich:

In einem nach Adsorption der Steroidhormone an Florisil gewonnenen Eluat lassen sich die 17 - KS und die 17-OHCS colorimetrisch nicht nachweisen.

III. Aus AII und BI ist ersichtlich, daß ein nach der Flo/Chol-Methode gewonnenes Eluat sowohl den colorimetrischen Nachweis der 17 - OHCS nach Porter und Silber als auch die gaschromatographische Bestimmung der 17 -KS zuläßt.

IV. Für den colorimetrischen Nachweis der 17 - OHCS werden 2 ml des Eluates, für die GC der 17 - KS 1 ml gebraucht. Mit den restlichen 2 ml wäre der gas-chromatographische Nachweis der 17 - OHCS theoretisch möglich. Er scheitert aus zwei Gründen:

1. Bei der Verwendung von 2 ml Eluat gelangt nur 1/5 000 TM auf die Säule des Gas-Chromatographen, während 1 / 1000 erforderlich ist.
2. Die Schwierigkeiten bei der Gewinnung der MO-TMSi-Äther weisen auf Unzulänglichkeiten der Methode hin. Man gerät bei Verwendung eines nach der Flo/Chol-Methode gewonnenen Eluates an die Grenze der Leistungsfähigkeit der MO-TMSi-Methode.

Die 3er-Kombination

ein Eluat - colorimetrischer Nachweis der 17 - OHCS  
- gas-chromatographischer Nachweis der 17-KS  
- gas-chromatographischer Nachweis der 17-OHCS

ist nicht durchführbar. Man muß sich mit der 2er-Kombination

ein Eluat - colorimetrischer Nachweis der 17 - OHCS  
- gas-chromatographischer Nachweis der 17-KS

begnügen.

Der gas-chromatographische Nachweis der 17 - OHCS ist für sich allein durchführbar, aber

- a, nur unter Verwendung des gesamten Eluates
- b, nur bei Urinproben von Patienten mit hoher 17 - OHCS - Ausscheidung.

## ZUSAMMENFASSUNG

Im ersten Teil der Arbeit werden die allgemeinen Voraussetzungen besprochen: das Prinzip des Einsatzes des Adsorptionsmittels Florisil und des Anionenaustauschers Cholestyramin, die Methode zur Bestimmung der Wiederfindungsrate ( recovery ) der radioaktiv markierten Steroidhormone und die benötigten Materialien.

Grundschritte aller angeführten Aufbereitungsmethoden sind:

1. Ansetzen
2. Hydrolyse
3. Extraktion
4. Elution
5. Nachweisreaktion
6. Messung.

Im zweiten Teil der Arbeit werden die ausgearbeiteten Methoden einzeln beschrieben und diskutiert, die gewonnenen Ergebnisse angeführt und kritisch geprüft. Ein eigenes Kapitel ist den Kombinationsmöglichkeiten der einzelnen Methoden untereinander gewidmet.

### Die wesentlichen Ergebnisse waren:

- AI. Die Methode zur colorimetrischen Bestimmung der 17 - KS zeigte eine radioaktive recovery von 79,1 % für  $^{14}\text{C}$ -DHEA, eine stumme recovery von 85,3 % für DHEA, eine Korrelanz zur Originalmethode von 0,922.
- AII. Die Methode zur colorimetrischen Bestimmung der 17 - OHCS zeigte eine radioaktive recovery von 68,5 % für  $^3\text{H}$ -THF, eine stumme recovery von 76,8 % für F, von 66,8 % für THE, von 62,1 % für THF, eine Korrelanz zur Originalmethode von 0,913.
- BI. Die Methode zum gas-chromatographischen Nachweis der 17 - KS in dem nach der Flo/Chol-Methode gewonnenen Eluat zeigte im Vergleich zu der Florisil- $\text{Al}_2\text{O}_3$ -Methode keine Verschiebung der Relation Andro/Ätio und keine "Geister-peaks". Mit ihr war quantitatives Arbeiten möglich.

- BII. Die Methode zum gas-chromatographischen Nachweis der 17 - OHCS in dem nach der Flo/Chol-Methode gewonnenen Eluat erbrachte Retentionszeiten für THF, THE und F in der den veröffentlichten Befunden entsprechenden Größenordnung. Der Nachweis von THF, THE und F in Urinproben gelang. Quantitatives Arbeiten war mit der Methode nicht möglich.
- C. Methode AII und BI konnten miteinander so kombiniert werden, daß mit einem Eluat
- a, der colorimetrische Nachweis der 17 - OHCS
  - b, der gas-chromatographische Nachweis der 17 - KS möglich wurden.

Die Ergebnisse zeigen, daß mit dem Einsatz des Florisils und des Cholestyramins neue Wege der Extraktion von Steroidhormonen aus wässrigen Lösungen gefunden worden sind.

LITERATUR

- 1 BAILEY, E.: The use of gas liquid chromatography in the assay of some corticosteroids in urine.  
J. Endocrin. 28 , 131 , 1964
- 2 BAILEY, E.: The estimation of unconjugated cortisol metabolites in urine by gas chromatography. In Gas Chromatography of Steroids in Biological Fluids (ed. M.B. LIPSETT),  
p. 57-65, New York , Plenum Press , 1965
- 3 BAILEY, E.: The estimation of cortisol, prednisolone and some of their unconjugated metabolites in biological fluids using gas liquid chromatography. Gas Chromatography of Steroids, Memoir, Society for Endocrinology 16 , 183 , 1967
- 4 BEERTHUIS, R.K., J.H. RECOURT: Sterol Analysis by Gas Chromatography.  
Nature 186 , 372 , 1960
- 5 BIRKHOFER, L., A. RITTER und W. GIESSLER:  
Bis-silylierte Carbonsäureamide.  
Angew. Chem. 75 , 93 , 1963
- 6 BREUER, H. und W. NOCKE: Bestimmung von Steroidhormonen.  
Der Internist 2 , 63 , 1968
- 7 BROOKS, C.J.W.: Studies of acetylated corticosteroids and related 20 - oxopregnane derivatives by gas-liquid-chromatography.  
Analyt. Chem. 37 , 636 , 1965
- 8 BROOKS, C.J.W., E.M. CHAMBAZ, W.L. GARDINER and E.C.HORNING:  
Analysis and characterisation of steroids by gas chromatography and associated methods.  
Proceedings 2 nd Int. Congr. Hormon. Steroids, Milan 1966 , p. 366
- 9 BROOKS, C.J.W., and D.J. HARVEY: Gas chromatographic and mass spectrometric studies of oximes derived from 20-oxosteroids.  
Steroids 15:2 , 283, 1970

- 10 BRUHL, W.: Leber- und Gallenwegserkrankungen.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1970
- 11 CHAMBAZ, E.M., E.C. HORNING: Steroid Trimethylsilyl Ethers.  
Analyt. Letters 1 (3) , 201, 1967
- 12 CHAMBAZ, E.M., G. MAUME, B. MAUME, E.C. HORNING:  
Silylation of Steroids. Formation of Enol Tri-  
methylsilyl Ethers and Oxysilylation Products.  
Analyt. Letters 1 (12) , 749 , 1968
- 13 CHAMBAZ, E.M., C. BROOKS, M. HORNING, E. HORNING et R.HILL:  
Stéroïdes urinaires du nouveau-né: Caractéri-  
sation par chromatographie gazeuse et spectro-  
métrie de masse de quatre Androstène-tétrols.  
C.R. Acad. Sc. Paris 268 , 2817 , 1969
- 14 CHAMBAZ, E.M. and E.C. HORNING: Conversion of Steroids to  
Trimethylsilyl Derivatives for Gas Phase Ana-  
lytical Studies: Reactions of Silylating Rea-  
gents.  
Analyt. Biochem. 30 , 7 , 1969
- 15 CHAMBAZ, E.M., C. MADANI: Analyse en phase gazeuse des sté-  
roïdes hormonaux. Possibilités d'application  
dans leur exploration en physiopathologie.  
Rev. franç. Gynéc. Obstet. 65 , 263 , 1970
- 16 COOPER, J.A. and B.G. CREECH: The Application of Gas-Li-  
quid Chromatography to the Analysis of Urina-  
ry 17 - Ketosteroids.  
Analyt. Biochem. 2 , 502 , 1961
- 17 CRANE, M.G. and J.J. HARRIS: Urinary Corticoids by Gas  
Chromatography. In: Gas Chromatography of  
Steroids in Biological Fluids (ed. M.B. LIP-  
SETT), p. 73-88 , New York , Plenum Press, 1965
- 18 DORFNER, K.: Ionenaustauscher.  
Verlag Walter de Gruyter & Co, Berlin , 1970
- 19 DRAY, F. and I. WELIKY: Identification of O-Methyloximes  
of Ketosteroids by Gas Chromatography, Thin-  
Layer Chromatography, Mass Spectra, and Ki-  
netic Studies.  
Analyt. Biochem. 34 , 387 , 1970

- 20 EGLINTON, G., R.J. HAMILTON, R. HODGES, R.A. RAPHAEL:  
Gas Liquid Chromatography of natural products  
and their derivatives.  
Chem. and Ind. July , 955 , 1959
- 21 EIK-NES, K.B. and E.C. HORNING: Gas Phase Chromatography.  
Monographs on Endocrinology 2, Springer-Verlag,  
Berlin-Heidelberg-New York, 1968
- 22 ENGEL, L.L., A.M. NEVILLE, J.C. ORR and P.R. RAGGATT:  
Quantitative gas chromatography of steroid me-  
thoximetrimethylsilyl ethers.  
Steroids 16 , 377 , 1970
- 23 FALES, H.M. and T. LUUKKAINEN: O-Methyloximes as Carbonyl  
Derivatives in Gas Chromatography, Mass Spec-  
trometry, und Nuclear Magnetic Resonance.  
Analyt. Chem. 37 , 955 , 1965
- 24 FALLON, H.J. and J.W. WOODS: Response of hyperlipoprotei-  
nemia to cholestyramine resin.  
J. Am. Med. Assoc. 204 , 1161 , 1968
- 25 FRANCE, J.T., N.L. McNIVEN, R.I. DORFMAN: Determination of  
Micro-Quantities of Androsterone, Aetiochola-  
nolone and Dehydroepiandrosterone by Gas-Li-  
quid Chromatography.  
Acta endocrin. (Kbh.) Suppl. 90 , 71 , 1964
- 26 FRENSDORF, E.L., E.J. VanKAMPEN and W. HOEK: Urinary gas-  
chromatographic steroid spectra and testicu-  
lar tumours.  
Clin. Chim. Acta 28 , 77 , 1970
- 27 FRIED, J., E.F. SABO, P. GRABOWICH, L.J. LERNER, W.B. KESS-  
LER, D.M. BRENNAN and A. BORMAN: Progestatio-  
nally active acetals and ketals of 16alpha,  
17alpha-dihydroxyprogesterone.  
Chem. and Ind. 1961 , p. 465
- 28 GARDINER, W.L., C.J.W. BROOKS, E.C. HORNING, R.M. HILL:  
Urinary steroid pattern of the human newborn  
infant.  
Bioch. Biophys. Acta 130 , 278 , 1966

- 29 GARDINER, W.L. and E.C. HORNING: Gas-liquid chromatographic separation of  $C_{19}$  and  $C_{21}$  human urinary steroids by a new procedure.  
Bioch. Biophys. Acta 115 , 524 , 1966
- 30 HAAHTI, E.O.A., W.J.A. VANDENHEUVEL, E.C. HORNING: Separation of Urinary 17-Ketosteroids by Gas Chromatography.  
Analyt. Biochem. 2 , 182 , 1961
- 31 HAMMOND, K.B. and H. LEACH: The gas chromatography of pregnane series steroids.  
Clin. Chim. Acta 11 , 584 , 1965
- 32 HAMMOND, K.B. and H. LEACH: The gas chromatography of human steroids as the trimethylsilyl ethers.  
Clin. Chim. Acta 12 , 363 , 1965
- 33 HARA, S., K. OKA, Y. IKE: Quantitative Resolution of Syn and Anti Isomers of Steroidal alpha, beta-Unsaturated Oximes and O-methyloximes.  
Chem. and Ind. 20 , 832 , 1967
- 34 HARTMAN, I.S., H.H. WOTIZ: A Method for the Simultaneous Separation of  $C_{19}O_2$  and  $C_{19}O_3$  17-Ketosteroids and Progesterone Metabolites by Gas Chromatography.  
Steroids 1 , 33 , 1963
- 35 HARTMAN, I.S., and H.H. WOTIZ: Studies in Steroid Metabolism. XIX. The Relation of Gas-Chromatographic Retention Time to the Structure of Steroids and Derivatives.  
Biochim. Biophys. Acta 90 , 334 , 1964
- 36 HOEK, W. and E.J. VanKAMPEN: Urinary steroid spectra by gas chromatography.  
Clin. Chim. Acta 19 , 371 , 1968
- 37 HORNING, E.C., E.A. MOSCATELLI and C.C. SWEeley: Polyester liquid phases in gas-liquid-chromatography.  
Chem. and Ind. June 20 , 751 , 1959

- 38 HORNING, E.C., W.J.A. VANDENHEUVEL, B.G. CREECH, D. GLICK:  
Separation and Determination of Steroids by  
Gas Chromatography.  
Methods of Biochemical Analysis XI, Inter-  
science Ed., New York 1963
- 39 HORNING, E.C., T. LUUKKAINEN, E.O.A. HAAHTI, B.G. CREECH,  
W.J.A. VANDENHEUVEL: Studies of human stereo-  
idal hormones by gas chromatographic techniques.  
Recent Progr. Hormone Res. 19 , 57 , 1963
- 40 HORNING, E.C., W.L. GARDINER and C.J.W. BROOKS: Gas chroma-  
tographic and gas chromatographic-mass spectro-  
metric procedures for the study of human steroid  
hormones and their metabolites.  
Proceedings 2 nd Int. Congr. Hormon. Steroids,  
Milan 1966 , p. 197
- 41 HORNING, E.C., C.J.W. BROOKS, L. JOHNSON and W.L. GARDINER:  
Separation, Identification and Estimation of  
Human Steroid Hormones and their Metabolites:  
Applications to Adrenocortical Steroids.  
Separation Sci. 1 (5) , 555 , 1966
- 42 HORNING, E.C., M.G. HORNING, N. IKEWAWA, E.M. CHAMBAZ, P.I.  
JAAKONMAKI and C.J.W. BROOKS: Studies of Analy-  
tical Separations of Human Steroids and Steroid  
Glucuronides.  
J. of Gas Chromatography 5 , 1967 , p. 283
- 43 HORNING, M.G., E.C. CHAMBAZ, C.J. BROOKS, A.M. MOSS, E.A.  
BOUCHER, E.C. HORNING and R.M. HILL: Charakte-  
risation and Estimation of Urinary Steroids of  
the Newborn Human by Gas-Phase Analytical Methods.  
Analyt. Biochem. 31 , 512 , 1969
- 44 HORNING, E.C. and B.F. MAUME: Derivatives of Aldosterone for  
Gas Phase Analysis.  
J. of Chromatog. Sci. 7 , 411 , 1969
- 45 HORNING, E.C. and M.G. HORNING: Plasma acids.  
Meth. Med. Res. 12 , 393 , 1970

- 46 HORNING, M.G., E.A. BOUCHER, A.M. MOSS: The Study of Urinary Acids and Related Compounds by Gas Phase Analytical Methods.  
J. of Gas Chromatography 5 , 297 , 1967
- 47 HORNING, M.G., A.M. MOSS and E.C. HORNING: Formation and Gas-Liquid Chromatographic Behavior of Isometric Steroid Ketone Methoxime Derivatives.  
Analyt. Biochem. 22 , 284 , 1968
- 48 HUBENER, H.J. und W.H. STAIB: Biochemie der Nebennierenrindenhormone.  
Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1965
- 49 VanKAMPEN, E.J., W. HOEK: Urinary steroid spectrum by gas chromatography.  
Clin. Chim. Acta 16 , 442 , 1967
- 50 KELLY, R.W.: Dimethyldiacetoxy silane as a silylating reagent. A new technique for forming siliconides of corticosteroids.  
J. of Chromatog. 43 , 229 , 1969
- 51 KELLY, R.W.: A new cyclic silyl dioxy derivative of a cis-diol.  
Tetrahedron Letters 12 , 967 , 1969
- 52 Kelly, R.W.: The gas chromatography of some new silyl derivatives of cortisone, cortisol and related compounds.  
Steroids 13:4 , 507 , 1969
- 53 KLEBE, J.F., H. FINKBEINER and D.M. WHITE: Silylations with Bis (trimethylsilyl) acetamide, a Highly Reactive Silyl Donor.  
J. of the Amer. Chem. Soc. 88:14 , 3390, 1966
- 54 KIRSCHNER, M.A. and H.M. FALES: Gas Chromatographic Analysis of 17-Hydroxycorticosteroids by Means of their Bismethylenedioxy Derivatives.  
Analyt. Chem. 34 , 1548 , 1962
- 55 KIRSCHNER, M.A. and M.B. LIPSETT: The analysis of urinary steroids using Gas-Liquid Chromatography.  
Steroids 3 , 277 , 1964

- 56 KIRSCHNER, M.A., M.B. LIPSETT and D.R. COLLINS: Analysis of Steroids in Urine and Blood Using Gas-Liquid Chromatography.  
J. of Gas Chromatography, Nov. 1964 , p. 360
- 57 KITTINGER, G.W.: Quantitative gas chromatography of 17-deoxycorticosteroids and other steroids produced by the rat adrenal gland.  
Steroids 3 , 21 , 1964
- 58 KITTINGER, G.W.: Quantitative Gas Chromatography of Adrenal Cortical Steroids.  
Steroids 11 , 47 , 1968
- 59 KROMAN, H.S., M.L. MOSKOVITZ, S.R. BENDER and A.N. BREST: The Gas Chromatographic Separation of Micro-Quantities of Androgens.  
J. of Gas Chromatography 4 , 147 , 1966
- 60 KUKSIS, A.: Newer developments in determination of bile acids and steroids by gas chromatography.  
Methods of Biochemical Analysis XIV , Interscience Ed., p. 325-454 , New York 1966
- 61 LANGER, S.H., R.A. FRIEDAL, J. WENDER and A.C. SHARKEY: A New Mass Spectrometric Method for Determining Alcohols and Water in Complex Mixtures. The Fischer-Tropsch Product.  
Analyt. Chem. 30 , 1353 , 1958
- 62 LIPSETT, M.B.: Gas Chromatography of Steroids in Biological Fluids.  
New York, Plenum Press, 1965
- 63 LUESTSCHER, J.A., R.G. GOULD: Gas-Liquid Chromatography of the Tetrahydro Derivatives of Cortisol isolated from Urine.  
J. of Chromatog. 13 , 350 , 1964
- 64 LUUKKAINEN, T., W.J.A. VANDENHEUVEL, E.O.A. HAAHTI, E.C. HORNING: Gas-chromatographic behavior of trimethylsilyl-ethers of steroids.  
Biochim. Biophys. Acta 52 , 599 , 1961

- 65 LUUKKAINEN, T., W.J.A. VANDENHEUVEL, E.C. HORNING: An Estrogen Determination Method using Gas Chromatography. *Biochim. Biophys. Acta* 62 , 153 , 1962
- 66 MAKIN, H.L.J.: The gas-liquid chromatography of steroid formates in the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia. *Proceedings of the Society for Endocrinology, J. Endocrin.* 43 , 47 , 1969
- 67 MAKITA, M. and W.W. WELLS: Quantitative Analysis of Fecal Bile Acids by Gas-Liquid Chromatography. *Analyt. Biochem.* 5 , 523 , 1963
- 68 MENINI, E. and J.K. NORBYNBERSKI: An approach to the systematic analysis of urinary steroids. *Biochem. J.* 95 , 1 , 1965
- 69 MERITS, I.: Gas-liquid chromatography of adrenal cortical steroid hormones. *J. of Lipid Res.* 3 , 126 , 1962
- 70 MURPHY, D. and H.F. WEST: Urinary 17-hydroxycorticosteroids measured by gas chromatography. *J. Endocrin.* 36 , 331 , 1966
- 71 NEHER, R.: Zitat nach HÜBENER-STAIß: Biochemie der Nebennierenrindenhormone S. 181 in: H. Sobotka, C.P. Stewart: *Advanc. clin. Chem.* S. 127, New York - London 1958
- 72 NOIRET, R. et R. DEVIS: Fractionnement sur colonne de flo-risil des phenolstéroïdes, du "pregnandiol", du "prégnanetriol", des 17-cétostéroïdes et des stéroïdes alpha-cétols. *Ann. Biol. clin.* 24 , 1179 , 1966
- 73 PIERCE, A.E.: Silylation of Organic Compounds. *Pierce Chemical. Co., Rockford/Illinois*, 1968
- 74 POLVANI, F., M. SURACE, M. LUISI: International Endocrinological Symposia: Gas Chromatographic Determination of Hormonal Steroids. *Academic Press, New York and London*, 1967

- 75 RATH, L., M. WIEDEMANN und H.J. KARL: Bestimmung des Metabolismus und der Produktionsrate von Testosteron, Dehydroepiandrosteron und Dehydroepiandrosteronsulfat.  
Z. Anal. Chem. 252 , 290 , 1970
- 76 ROSENFELD, R.S.: Gas chromatography of some C-21 metabolites of cortisol.  
Steroids 4 , 147 , 1964
- 77 RUCHELMAN, M.W.: Automatic Solid Injection System.  
J. of Gas Chromatography July 1966 , p. 265
- 78 RYHAGE, R.: Use of a Mass Spectrometer as a Detector and Analyzer for Effluents Emerging from High Temperature Gas-Liquid Chromatography Columns.  
Analyt. Chem. 36 , 759 , 1964
- 79 SPARAGANA, M., E.H. KEUTMANN, W.B. MASON: Quantitative Determination of individual  $C_{19}O_2$  and  $C_{19}O_3$  Urinary 17-Ketosteroids by Gas Chromatography.  
Analyt. Chem. 35 , 1231 , 1963
- 80 SPARAGANA, M.: Determination of urinary tetrahydrocortison, tetrahydrocortisol and  $3\alpha$ -allotetrahydrocortisol by gas chromatography.  
Steroids 6 , 583 , 1965
- 81 SPARAGANA, M., L. KUCERA, G. PHILLIPS and C. HOFFMANN: Automated determination of urinary corticosteroids.  
Steroids 15 , 353 , 1970
- 82 SWEETLEY, C.C., E.C. HORNING: Microanalytical Separation of Steroids by Gas Chromatography.  
Nature 187 , 144 , 1960
- 83 VANDENHEUVEL, F.A., G.J. HINDERKS, J.C. NIXON: Precise Ultra-micro Determination of Steroid Hormones by Combined TLC and GLC Analysis.  
J. of Amer. Oil Chem. Soc. 42 , 283 , 1965
- 84 VANDENHEUVEL, W.J.A., C.C. SWEETLEY, E.C. HORNING: Separation of Steroids by Gas Chromatography.  
J. Am. Chem. Soc. 82 , 3481 , 1960

- 85 VANDENHEUVEL, W.J.A. and E.C. HORNING: Gas chromatography of adrenal cortical steroid hormones.  
Bioch. Biophys. Res. Comm. 3 , 356 , 1960
- 86 VANDENHEUVEL, W.J.A., E.O.A. HAAHTI, E.C. HORNING: A new Liquid Phase for Gas Chromatographic Separations of Steroids.  
J. Am. Chem. Soc. 83 , 1513 , 1961
- 87 VANDENHEUVEL, W.J.A., B.G. CREECH and E.C. HORNING: Separation and Estimation of the Principal Human Urinary 17-Ketosteroids as Trimethylsilyl Ethers.  
Analyt. Biochem. 4 , 191 , 1962
- 88 VANDENHEUVEL, W.J.A. et E.C. HORNING: Analyse des stéroïdes par chromatographie en phase gazeuse.  
Bull. Soc. Chim. Biol. 47 , 945 , Paris 1965
- 89 VANDENHEUVEL, W.J.A., W.L. GARDINER and E.C. HORNING: A comparison of the behavior of the hydrocarbons used as reference standards in the determination of "steroid numbers" and "methylene units"; selective retention of steroid hydrocarbons by polar stationary phases.  
J. of Chromatog. 26 , 387 , 1967
- 90 VANDENHEUVEL, W.J.A.: The gas-liquid chromatography of dimethylsilyl, trimethylsilyl and chloromethyldimethylsilyl ethers of steroids. Mechanism of silyl ether formation and effect of trimethylsilylation upon detector response.  
J. of Chromatog. 27 , 85 , 1967
- 91 VANDENHEUVEL, W.J.A., J.L. PATTERSON, K.L.K. BRALY: Use of bis-trimethylsilylacetamide in the preparation of derivatives for the gas-liquid chromatography of certain adrenocortical steroids.  
Biochim. Biophys. Acta 144 , 691 , 1967
- 92 VANDENHEUVEL, W.J.A. and E.C. HORNING: Gas-Liquid Chromatographic (GLC) Methods for the Analysis of Steroids and their Derivatives.  
Med. Res. Engin. 7 , 10 , 1968

- 93 VESTERGAARD, P. and E. RAABO: Gas Chromatographic Separation of Androsterone and Etiocholanolone From Their Delta<sup>9</sup> Analogs.  
J. of Gas Chromatography 11 , 422 , 1966
- 94 WAKABAYASHI, M. and W.H. FISHMAN: The Comparative Ability of  $\beta$ -Glucuronidase Preparations (Liver, Escherichia coli, Helix pomatia, and Patella vulgata) to Hydrolyze Certain Steroid Glucosiduronic Acids.  
J. of Biol. Chem. 236 , 996 , 1961
- 95 WIEDEMANN, M., L. RAITH und H.J. KARL: Untersuchungen über die Adsorption von Steroiden an Florisil und Amberlite. Methode zur getrennten Bestimmung der Glucuronide und Sulfate von Androgenen.  
Z. Anal. Chem. 252 , 287 , 1970
- 96 WOTIZ, H.H., S.J. CLARK: Newer Developments in the Analysis of Steroids by Gas-Chromatography.  
Methods of Biochemical Analysis XVIII , Interscience Ed., p. 339-372 , New York 1970

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H. Schwiegk,  
der mich in seiner Klinik arbeiten ließ.  
Besonders danke ich Herrn Professor Dr.H.J. Karl  
für die Überlassung des Themas und die freundliche  
Unterstützung,  
Herrn Privatdozenten Dr.L. Raith für die wert-  
vollen Ratschläge und Anregungen,  
Herrn Dr.med. M. Wiedemann für die bereitwillige  
Hilfe.



## LEBENS LAUF

Am 11. September 1947 wurde ich in Pontedera, Italien, als Sohn des Tarifrechtlers Andreas Bauer und dessen Ehefrau Dr. Nicla Bauer, geb. Sergianni, geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule an der Gabelsbergerstraße in München, von 1957 bis 1966 das Wittelsbacher Gymnasium, humanistische Abteilung, ebenfalls in München. Im Juli 1966 legte ich an dem genannten Gymnasium die Reifeprüfung ab (Note 1).

Im Wintersemester 1966/67 nahm ich das Studium der Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität in München auf, bestand im Sommersemester 1967 den ersten Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung (Note 1) und im Wintersemester 1968/69 den zweiten Abschnitt (Note 1).

Mein klinisches Studium beendete ich im Frühjahr 1972 mit dem medizinischen Staatsexamen (Note 1).

In den Jahren 1969 - 1972 war ich während der Wintersemester als Co-Assistent am Anatomischen Institut tätig.





